

Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Bioquímica

***Papel del Componente 3 del Complemento  
(C3) como mediador de C/EBP $\beta$  en los  
procesos inflamatorios y excitotóxicos del  
Sistema Nervioso Central.***

Tesis Doctoral

**M<sup>a</sup> Elena Hernández Encinas**

Madrid, 2014



Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid



***Papel del Componente 3 del Complemento (C3)  
como mediador de C/EBP $\beta$  en los procesos  
inflamatorios y excitotóxicos del Sistema Nervioso  
Central.***

**M<sup>a</sup> Elena Hernández Encinas**  
Licenciada en Biología  
Directoras de Tesis: Dra. Ana María Pérez Castillo y  
Dra. Diana Aguilar Morante

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid “Alberto Sols”  
CSIC-UAM





MINISTERIO  
DE CIENCIA E  
INNOVACIÓN



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
"ALBERTO SOLS"

**Ana María Pérez Castillo**, Profesora de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas adscrita al Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", y **Diana Aguilar Morante**, Doctora en Biología Molecular, Bioquímica y Biomedicina,

Certifican que:

**Elena Hernández Encinas**, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado su Tesis Doctoral titulada "*Papel del Componente 3 del Complemento (C3) como mediador de C/EBP $\beta$  en los procesos inflamatorios y excitotóxicos del Sistema Nervioso Central*" bajo nuestra dirección, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM).

Consideramos que la presente Tesis Doctoral reúne las condiciones de originalidad y rigor necesarios y se encuentra en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar a grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid. Y para que conste a todos los efectos, firmamos el presente certificado,

En Madrid, a 03 de Febrero de 2014.

Dra. Ana María Castillo  
Directora de Tesis  
Profesora de Investigación, CSIC  
CIBERNED

Dra. Diana Aguilar Morante  
Directora de Tesis  
CSIC





*“Muchos de los avances científicos no hubieran sido posible sin ellos....gracias”*

*Quería dar las gracias en primer lugar a “mi jefa” la Dra Ana María Pérez Castillo, por darme la oportunidad de entrar en el laboratorio y confiar en mí para realizar este proyecto y en segundo lugar al Consejo Superior de Investigaciones Científicas por haberme concedido la beca predoctoral I3P que me ha permitido desarrollar este trabajo.*

*Sin olvidarme de mis compañeros y mi familia que me han apoyado en todo momento.*

*A todos muchas gracias.*







# Resumen



CCAAT/Enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) es un factor de transcripción que inicialmente fue identificado como regulador de procesos de diferenciación e inflamación principalmente en tejido adiposo e hígado. Sin embargo, su función en el cerebro ha sido descrita más recientemente. Estudios previos de nuestro laboratorio revelaron que C/EBP $\beta$  estaba implicada en procesos de inflamación y daño cerebral, y que los ratones carentes de este gen eran menos susceptibles al daño excitotóxico inducido por ácido kaínico. Con el fin de analizar los mecanismos a través de los cuales C/EBP $\beta$  regula estos procesos, lo primero que hicimos fue un análisis de microarrays con RNA aislado de hipocampo de ratones C/EBP $\beta^{+/+}$  y C/EBP $\beta^{-/-}$ . Algunos de los genes expresados diferencialmente, eran genes implicados en inflamación y daño cerebral. Uno de esos genes es el del componente 3 del complemento (C3), cuya expresión aumenta en los ratones C/EBP $\beta^{+/+}$  y que está implicado en diversos desórdenes cerebrales. En este trabajo nos hemos centrado en el posible papel de C3 como mediador de C/EBP $\beta$  tras un daño excitotóxico e inflamatorio. Estudios de transfección con el promotor de C3 y estudios *in vitro* de daño neural, mostraron que C/EBP $\beta$  regula directamente la expresión de C3 tras un daño excitotóxico e inflamatorio. En este trabajo mostramos también que la reducción de C3 mediante RNA de interferencia, reduce la producción de agentes proinflamatorios como IL-1 $\beta$  y COX-2, así como la de nitritos en cultivos primarios de astrocitos tratados con lipopolisacárido. Usando un modelo *in vivo* de excitotoxicidad mostramos que ambas proteínas aumentan principalmente en la región CA3 del hipocampo. Por último, demostramos que ratones carentes de C/EBP $\beta$  presentan una importante reducción de la expresión de C3 tras la inyección de ácido kaínico. Estos resultados sugieren que C/EBP $\beta$  podría estar implicada en enfermedades neurológicas vinculadas a procesos inflamatorios y excitotóxicos, al menos en parte a través de la regulación directa de C3.





# Abstract



The CCAAT/Enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) is a transcription factor, which was first identified as a regulator of differentiation and inflammatory processes mainly in adipose tissue and liver; however its function in the brain was largely unknown for many years. Previous studies from our laboratory indicated that C/EBP $\beta$  is implicated in inflammatory process and brain injury, since mice lacking this gene were less susceptible to kainic acid-induced injury. In order to further analyze the mechanisms by which C/EBP $\beta$  was involved in these processes, we first performed cDNA microarrays analysis using hippocampal RNA isolated from C/EBP $\beta$ <sup>+/+</sup> and C/EBP $\beta$ <sup>-/-</sup> mice. Among the genes displaying significant changes in expression, some of them were involved in inflammatory processes and brain injury. One of those genes which expression was increased in C/EBP $\beta$ <sup>+/+</sup> animals was complement component 3 (C3), a gene implicated in different brain disorders. This work has been focused in the possible involvement of C3 in the effects of C/EBP $\beta$  in excitotoxic injury. Transfection studies using C3 promoter and *in vitro* studies of neural damage, demonstrated that C/EBP $\beta$  directly regulates the expression of C3 following an excitotoxic and inflammatory injuries. In addition, we show that down-regulation of C3 by siRNA reduces proinflammatory molecules such as IL-1 $\beta$  and COX-2 and leads to a decrease of nitrite levels in an astrocyte culture after lipopolysaccharide treatment. By using an *in vivo* model of excitotoxicity we demonstrate an increase of C/EBP $\beta$  and C3 in the CA3 subfield of the hippocampus. Finally, we show that mice lacking C/EBP $\beta$  exhibit a marked reduction in C3 expression after kainic acid injection. These results suggest that C/EBP $\beta$  could regulate brain disorders, in which excitotoxic and inflammatory processes are involved, at least in part through the direct regulation of C3.







# Índice



<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>5</b>
<b>Índice .....</b>	<b>9</b>
<b>Clave de abreviaturas.....</b>	<b>15</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>19</b>
<b>1. Proteínas C/EBP (CCAAT/Enhancer binding protein) .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1. Estructura de las C/EBPs.....</b>	<b>22</b>
<b>2. C/EBP<math>\beta</math> .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Gen C/EBP<math>\beta</math>: Isoformas.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Modificaciones post-traduccionales de C/EBP<math>\beta</math> .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3. Funciones de C/EBP<math>\beta</math> .....</b>	<b>26</b>
<b>2.4. Papel de C/EBP<math>\beta</math> en el Sistema Nervioso Central (SNC) .....</b>	<b>29</b>
<b>3. El sistema del complemento .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. El sistema del complemento en el sistema nervioso central.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1.1. Expresión de componentes del complemento en el cerebro .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1.2. Funciones del complemento en el SNC en condiciones normales (no patológicas) .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1.3. Papel del complemento en el SNC en situaciones patológicas ...</b>	<b>35</b>
<b>4. Componente 3 del complemento .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Papel de C3 en el SNC .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.1. Neurogénesis .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.2. Remodelación sináptica .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.3. Papel de C3 en patologías del SNC .....</b>	<b>38</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>41</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>45</b>

<b>1. Microarray .....</b>	<b>47</b>
<b>2. RT-PCR cuantitativa .....</b>	<b>47</b>
<b>3. Clonaje del promotor del gen C3 de ratón en el plásmido pGL4.10 .....</b>	<b>48</b>
<b>4. Mutagénesis dirigida .....</b>	<b>48</b>
<b>5. Transfecciones transitorias .....</b>	<b>49</b>
<b>6. Silenciamiento de C3 utilizando RNA de interferencia .....</b>	<b>49</b>
<b>7. Infección lentiviral .....</b>	<b>50</b>
<b>8. Estudios <i>in vitro</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>8.1. Cultivos celulares .....</b>	<b>51</b>
<b>8.1.1. Cultivos de células GL261 .....</b>	<b>51</b>
<b>8.1.2. Cultivos primarios de células gliales .....</b>	<b>51</b>
<b>8.2. Extracción de proteína total de cultivos celulares y Western blot .....</b>	<b>52</b>
<b>8.3. Inmunocitoquímica .....</b>	<b>53</b>
<b>8.4. Determinación de nitritos .....</b>	<b>53</b>
<b>9. Estudios <i>in vivo</i> .....</b>	<b>54</b>
<b>9.1. Animales .....</b>	<b>54</b>
<b>9.2. Modelo de daño excitotóxico .....</b>	<b>54</b>
<b>9.3. Extracción de proteína de tejidos y Western blot .....</b>	<b>54</b>
<b>9.4. Estudios histoquímicos .....</b>	<b>55</b>
<b>9.4.1. Obtención de muestras .....</b>	<b>55</b>
<b>9.4.2. Tinción histológica TUNEL (Terminal dUTP Nick End Labeling) .....</b>	<b>55</b>
<b>9.4.3. Tinción histológica con hematoxilina .....</b>	<b>56</b>
<b>9.4.4. Tinción con Fluoro-Jade B. ....</b>	<b>56</b>
<b>9.4.5. Inmunohistoquímica .....</b>	<b>56</b>
<b>9.4.5.1. Revelado con diaminobencidina .....</b>	<b>56</b>
<b>9.4.5.2. Fluorescencia .....</b>	<b>57</b>
<b>9.4.5.3. M.O.M Immunodetection kit (Mouse on Mouse) .....</b>	<b>58</b>
<b>10. Estadística .....</b>	<b>58</b>

<b>Resultados .....</b>	<b>59</b>
1. Análisis de microarrays del efecto de C/EBP $\beta$ en el transcriptoma de hipocampo de ratón .....	61
2. Regulación por LPS de la expresión de C/EBP $\beta$ Y C3 <i>in vitro</i> .....	63
2.1. Cultivos primarios de astrocitos de rata .....	63
2.2. Cultivos primarios de microglía de rata .....	65
2.3. Cultivos primarios de astrocitos de ratón .....	66
2.4. Línea BV2 de ratón .....	68
2.5. Efecto de C/EBP $\beta$ y C3 sobre la expresión de IL-1 $\beta$ y COX-2 y la producción de nitritos en astrocitos de ratón .....	69
3. Análisis del promotor de C3: regulación por C/EBP $\beta$ .....	71
4. Regulación de la expresión de C3 y C/EBP $\beta$ <i>in vivo</i> .....	74
4.1. Neurodegeneración hipocampal inducida por AK .....	74
4.2. Inducción por AK de la expresión de C3 y C/EBP $\beta$ en el hipocampo de ratón .....	76
4.3. Efecto del AK sobre la expresión de C3 y C/EBP $\beta$ en el hipocampo de rata .....	81
4.4. Análisis de los tipos celulares del hipocampo de rata donde C3 se induce por AK .....	83
<b>Discusión .....</b>	<b>89</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>105</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>109</b>





## Abreviaturas





**6-OHDA:** 6-hidroxidopamina  
**AD:** dominio de activación  
**AK:** Ácido Kaínico  
**Ap C/EBP:** Aplysia C/EBP  
**bZIP:** Región básica/Cremallera de Leucinas  
**C/EBP:** CCAAT/ Enhancer Binding Protein  
**C3:** Componente 3 del complemento  
**COX-2:** Ciclooxygenasa tipo 2  
**DAB:** Diaminobencidina  
**DS:** Desviación estándar  
**GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial  
**GLU:** Glutamato  
**IL-1 $\beta$ :** Interleuquina 1 $\beta$   
**KO:** knock out  
**LAP:** Proteína activadora del hígado  
**LIP:** Proteína inhibidora del hígado  
**LPS:** Lipopolisacárido  
**MAC:** membrane attack complex (complejode ataque a la membrana)  
**mRNA:** ARN mensajero  
**N2A:** Neuro2A  
**RD:** dominio regulador  
**shRNA:** Horquillas cortas de ARN (Short Hairpin RNA)  
**siRNA:** ARN pequeño de interferencia (Small Interferin RNA)  
**SNC:** Sistema Nervioso Central  
**TLR:** Toll like receptor (receptores de tipo Toll)  
**Wt:** wild type





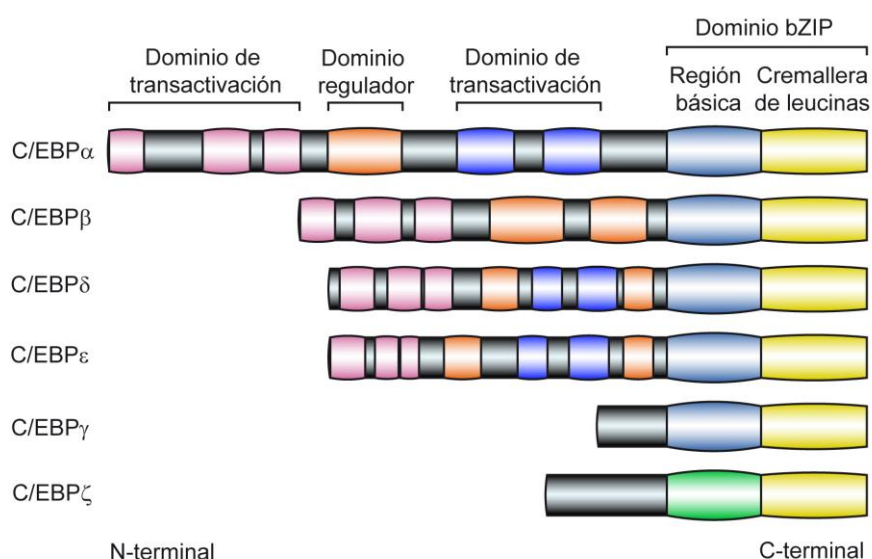
# Introducción



## 1. Proteínas C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein)

Las proteínas C/EBP constituyen una familia de factores de transcripción del tipo bZIP (basic región/leucine zipper). Todas las proteínas bZIP se caracterizan porque tienen, en su zona carboxilo terminal, un dominio de unión al DNA muy conservado, que está formado por dos secuencias de aminoácidos, una rica en aminoácidos básicos y otra rica en leucinas (cremallera de leucinas), de ahí su denominación bZIP. Ambas secuencias son necesarias para que la proteína se una eficazmente a secuencias específicas del DNA. Las proteínas bZIP se unen al DNA en forma de dímero, siendo la cremallera de leucinas determinante para la formación de dichos dímeros. Según su homología de secuencia, su capacidad de formar homo o heterodímeros con otras proteínas bZIP y la especificidad de unión al DNA, los factores de transcripción de tipo bZIP se agrupan en diversas familias. Las tres familias mayoritarias en los mamíferos son: la familia CREB/ATF (proteína de unión al elemento respuesta a AMP cíclico / factor de transcripción activador), la familia de proteínas AP-1 que incluye las protooncoproteínas-Fos/Jun, y la familia C/EBP. La familia C/EBP, a su vez, consta de seis miembros (**Figura 1**): C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\gamma$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\epsilon$ , C/EBP $\zeta$  que tienen, en numerosos tejidos, un importante papel regulando procesos de proliferación y diferenciación celular, supervivencia y/o apoptosis, metabolismo, inflamación, transformación y tumor génesis (Ramji and Foka, 2002, Poli, 1998, Zahnow, 2002). C/EBP $\alpha$  fue el primer miembro de la familia en ser identificado (Graves et al., 1986, Jakobsen et al., 2013), tiene una importante función en la regeneración hepática (Diehl, 1998, Mackey and Darlington, 2004), en la respuesta de fase aguda (Burgess-Beusse and Darlington, 1998) en la diferenciación de adipocitos (Cao et al., 1991, Darlington et al., 1998, Vernochet et al., 2009) en la diferenciación mieloide (Scott et al., 1992, Zhao et al., 2011), y en procesos inflamatorios (Tengku-Muhammad et al., 2000a, Tengku-Muhammad et al., 2000b). Está sobreexpresado en leucemia aguda mielocítica, y su supresión restablece la diferenciación granulocítica (Liss et al., 2013) C/EBP $\gamma$  (Roman et al., 1990) se caracteriza por la ausencia de dominios de transactivación y puede actuar como inhibidor del resto de las C/EBPs (Cooper et al., 1995). Está implicado en la maduración de los linfocitos citolíticos espontáneos (Kaisho et al., 1999). La expresión de C/EBP $\delta$  acompaña en muchos procesos a C/EBP $\beta$  (Valente et al., 2013), y está implicada en diferenciación de adipocitos (Cao et al., 1991) y de células mieloides (Scott et al., 1992), respuesta a fase aguda (Alam et al., 1992), e inflamación (Yan et al.,

2013), y posee un papel anti-apoptótico y anti-inflamatorio en células beta pancreáticas (Moore et al., 2012). C/EBP $\epsilon$  es el miembro más divergente de la familia C/EBP (Williams et al., 1991, Antonson et al., 1996, Chumakov et al., 1997), y está implicado en la activación de genes mieloides y sus niveles aumentan cuando se produce la diferenciación granulocítica (Morosetti et al., 1997, Yamanaka et al., 1997, Tagata et al., 2008). C/EBP $\zeta$ , más conocida como CHOP 10 (Ron and Habener, 1992), posee una región básica diferente al resto de las C/EBPs y no es capaz de unirse al DNA (O'Neil et al., 1990, Shuman et al., 1990). C/EBP $\zeta$  atenúa la capacidad de otras C/EBP de activar promotores de genes que contienen sitios de unión a estas proteínas, por lo que C/EBP $\zeta$  sería un dominante negativo de otras C/EBPs (Ron and Habener, 1992) y está implicada en inducción de la muerte celular (Zinszner et al., 1998) y su expresión es esencial para la activación de genes implicados en la respuesta a estrés del retículo endoplasmático (Wang et al., 1998). Las funciones de C/EBP $\beta$  (en la que se centra este trabajo) las describiremos más extensamente en el apartado 2.



**Figura 1. Estructura modular de los diferentes miembros de la familia C/EBP** (Johnson, 2005). Cada proteína C/EBP contiene un dominio bZIP con una cremallera de leucinas en su zona C-terminal, y adyacente una región básica altamente conservada que comparten todos los miembros de la familia. La zona N-terminal es la menos conservada y es la que contiene los dominios de transactivación.

### 1.1 Estructura de las C/EBPs

Los factores de transcripción C/EBP poseen, como hemos comentado, en su zona carboxilo terminal (C-terminal) el dominio de unión al DNA de tipo bZIP que está muy

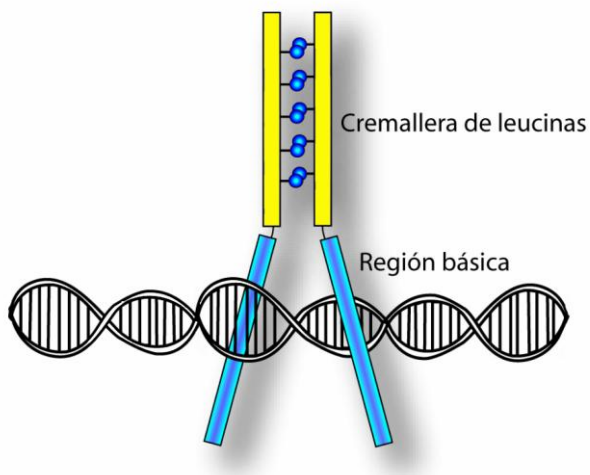
conservado, ya que presenta una homología superior al 90% entre las distintas proteínas C/EBP. Por el contrario, la zona amino terminal (N-terminal) está mucho menos conservada y en ella se han descrito diversos dominios reguladores de la transcripción (Tsukada et al., 2011) (**Figura 2**).

Cremallera de leucinas: Es una secuencia de aproximadamente 30 aminoácidos rica en leucinas las cuales están situadas de manera que se repite una leucina cada siete aminoácidos. Esta secuencia se pliega formando una  $\alpha$ -hélice y, dado que ésta da una vuelta cada 3,6 aminoácidos, las cadenas laterales hidrófobas de las leucinas se sitúan a un lado de la hélice formando una banda que gira lentamente en sentido contrario al de la hélice (Landschulz et al., 1988). Esto le permite interactuar con otras estructuras hidrófobas semejantes (O'Shea et al., 1989) y es responsable de la homodimerización o heterodimerización con otros miembros de la familia C/EBP o con otras proteínas conteniendo motivos bZIP. Se ha descrito que esta región es capaz también de interactuar con otras proteínas que no presentan este motivo bZIP como el Factor Nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (Stein et al., 1993), CREB o el receptor de glucocorticoides (Nishio et al., 1993).

Región básica: Es una secuencia contigua a la cremallera de leucinas de unos 20 aminoácidos rica en aminoácidos básicos que es la responsable de la unión proteína/DNA. Los aminoácidos presentes en esta región forman también una  $\alpha$ -hélice y son los que contactan directamente con las bases del DNA y le confieren la especificidad de secuencia (Johnson, 1993, Agre et al., 1989). La distancia entre ambas regiones y la dimerización son imprescindibles para la unión al DNA (Pu and Struhl, 1991). Como resultado de la dimerización, las regiones básicas de unión al DNA de cada uno de los monómeros se acercarían entre sí para unirse a cada una de las partes contiguas de la secuencia consenso simétrica que reconocen. Las C/EBPs, con la excepción de C/EBP $\zeta$  reconocen la secuencia palindrómica de DNA: RTTGCGYAAY, donde R representa A ó G e Y representa C ó T (Osada et al., 1996).

Región N-terminal: La zona N-terminal de las C/EBPs está poco conservada y en ella se localiza la región de transactivación en la que se encuentran los dominios de activación (AD) y los dominios de represión o reguladores (RD) (**Figura 3**). Estos dominios RD pueden funcionar como atenuadores o como inhibidores de la transcripción. En condiciones basales las C/EBPs son inactivas (por sus dominios RD) y para ser activas

requieren de modificación covalente, por ejemplo por fosforilación o por interacción con otras proteínas (Williams et al., 1995).



**Figura 2. Modelo esquemático del dominio de unión al DNA de tipo bZIP y dimerización de las proteínas C/EBP.** Se muestra la estructura en forma de Y invertida adoptada por el dímero al unirse al DNA. Las hélices en amarillo corresponden a la cremallera de leucinas con las leucinas protuberantes representadas por las esferas azules. Las hélices en azul corresponden a la región básica por la que las proteínas contactan directamente con el DNA.

## 2. C/EBP $\beta$

La proteína C/EBP $\beta$  fue clonada de manera independiente en distintos laboratorios recibiendo diferentes nombres: IL-6DBP (proteína de unión al DNA dependiente de interleuquina 6 (Poli et al., 1990), NF-IL6 (factor nuclear implicado en la expresión de IL-6 (Akira et al., 1990), LAP (proteína activadora del hígado) (Descombes et al., 1990), AGP/EBP (proteína de unión a motivos C/EBP presentes en el promotor de la glicoproteína ácida  $\alpha 1$  (Shuman et al., 1990) y CRP2 (proteína 2 relacionada con C/EBP) (Williams et al., 1991). Actualmente el nombre más comúnmente utilizado desde que Cao y cols (Cao et al., 1991) propusieron la nomenclatura definitiva de las proteínas C/EBP, es el de C/EBP $\beta$ .

C/EBP $\beta$  se expresa en diversos tejidos entre los que se encuentran hígado, intestino, pulmón, ovario, tejido adiposo, glándula mamaria, bazo, riñón, cerebro y células mielocíticas y se ha implicado en numerosos procesos celulares, entre los que se encuentran la diferenciación de adipocitos y macrófagos, metabolismo de azúcares y lípidos, respuesta a fase aguda, inflamatoria e inmune y regeneración hepática (Hanson, 1998, Diehl, 1998, Darlington et al., 1998, Poli, 1998, Croniger et al., 1998, Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998, Ramji and Foka, 2002).

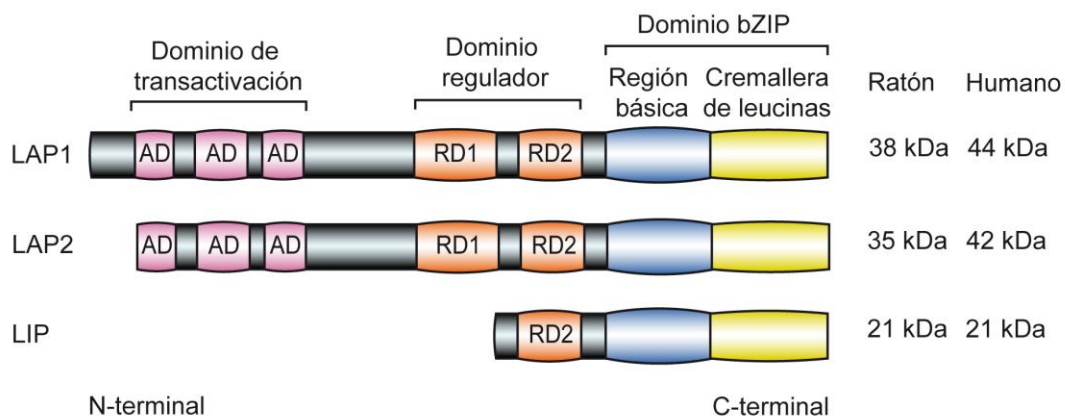
### 2.1 Gen C/EBP $\beta$ : Isoformas

El gen C/EBP $\beta$  se encuentra en el cromosoma 20 en humano, en el 2 en ratón y en el 3 en rata. Carece de intrones y genera un único transcrito a partir del que se generan, por



uso alternativo de distintos codones de iniciación, al menos, tres isoformas, que comparten la zona C-terminal (**Figura 3**). LAP1 es la isoforma completa (44 y 38 kDa en humano y rata/ratón, respectivamente), LAP2 (42 y 35 kDa en humano y rata/ratón, respectivamente) y LIP, proteína inhibidora de hígado (21 kDa). LAP2 y LIP son las isoformas mayoritarias (Descombes and Schibler, 1991).

En la zona N-terminal de C/EBP $\beta$  se localiza la región de transactivación en la que se encuentran 3 dominios de activación (AD1, AD2, AD3) y la región de regulación con dos dominios de represión (RD1 y RD2) (**Figura 3**). El dominio RD1 inhibe constitutivamente el dominio de transactivación haciendo que C/EBP $\beta$  adopte una conformación que impide el acceso a los dominios AD, mientras que RD2 inhibe a C/EBP $\beta$  induciendo una conformación que interfiere en la capacidad de la región básica para interactuar con el DNA (Williams et al., 1995). Consecuentemente, C/EBP $\beta$  permanecería básicamente inactiva hasta que su actividad se indujera por modificación postraduccional o interacción con otras proteínas. LIP carece de la mayor parte de la región N-terminal y solo conserva el dominio represor RD2 y por lo tanto, carece de actividad de transactivación, actuando como dominante negativo del resto de isoformas C/EBP $\beta$  (Descombes and Schibler, 1991). Sin embargo, LIP puede actuar también como un activador transcripcional mediante la interacción con otros factores de transcripción, como son el receptor de glucocorticoides, el receptor de la progesterona B, NF- $\kappa$ B, y Runx2 (*Runt-related transcription factor*) (Zahnow, 2009).



**Figura 3. Representación esquemática de las diferentes isoformas de la proteína C/EBP $\beta$ .** Las distintas isoformas se generan por uso alternativo de distintos codones de iniciación. Se muestra la localización de los distintos. **AD**: dominios de activación, dentro del dominio de transactivación. **RD**: dominios reguladores. **bZIP**: formado por la región básica y la cremallera de leucinas.

## 2.2. Modificaciones post-traduccionales de C/EBP $\beta$

C/EBP $\beta$  sufre diversas modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación, acetilación, metilación y sumoilación que juegan un papel crucial en la regulación de su actividad transcripcional, interacción proteína-proteína y localización subcelular.

Fosforilación: Es la principal forma de regulación de la actividad de C/EBP $\beta$  (Ramji and Foka, 2002, Schrem et al., 2004). C/EBP $\beta$  contiene múltiples sitios de fosforilación que modulan tanto su localización subcelular (Metz and Ziff, 1991) como su capacidad de transactivación y de unión al DNA (Piwien-Pilipuk et al., 2002, Kowenz-Leutz et al., 1994). Por ejemplo, la fosforilación secuencial de Thr-188, Ser-184 y Thr-179 por MAPK y por la glucógeno sintasa quinasa 3, es necesaria en la adipogénesis (Tang et al., 2005). Por otro lado, la fosforilación de Thr-217 por la quinasa S6 ribosomal contribuye al desarrollo de daño pulmonar y fibrosis en ratón (Buck and Chojkier, 2011).

Sumoilación: La sumoilación es un sistema de modificación postraducciona similar a la ubiquitinación, aunque sus consecuencias pueden ser muy diferentes. La sumoilación de la Lys-133 disminuye la función inhibitoria de los RD de C/EBP $\beta$  (Kim et al., 2002). La sumoilación bloquea la habilidad de C/EBP $\beta$  para limitar la proliferación de las células T a través de la inhibición del promotor de Myc (Berberich-Siebelt et al., 2006) y reprime la inducción del promotor de COX-2 por LAP1 (Wang et al., 2008).

Acetilación: La acetilación de ciertos residuos de lisina de C/EBP $\beta$  puede provocar tanto un aumento como una disminución de la actividad de unión al DNA y de la interacción con otras proteínas (Cesena et al., 2007, Nerlov, 2008). Por ejemplo la acetilación de C/EBP $\beta$  en Lys-215/216 disminuye su unión al promotor del gen Id-1 (Xu et al., 2003) y de la arginasa-1 (Serrat et al., 2012).

Glicosilación: La O-glicosilación (O-GlcNAc) de C/EBP $\beta$  en Ser-180/181 evita la fosforilación de Thr-188, Ser-184 y Thr-179 y la unión al DNA (Li et al., 2009).

Metilación: C/EBP $\beta$  puede ser metilada en la Lys-39, lo que inhibe su actividad de transactivación (Pless et al., 2008).

## 2.3. Funciones de C/EBP $\beta$

- *Diferenciación celular:* C/EBP $\beta$  está implicada en la diferenciación de adipocitos (Rosen, 2005, Hou et al., 2012, Lechner et al., 2013, Ishibashi et al., 2012), y células mieloides (Stoilova et al., 2013, Hayashi et al., 2013), entre otros tipos celulares. El papel de las proteínas C/EBP en la diferenciación de adipocitos ha sido extensamente estudiado

utilizando la línea celular 3T3-L1 (Lane et al., 1999) en la cual inducen la diferenciación de preadipocitos y modulan la expresión génica en el adipocito diferenciado (Darlington et al., 1998). Cuando se induce el programa de diferenciación en esta línea celular con una mezcla de hormonas adipogénicas, incluyendo insulina, glucocorticoides y factores que aumentan el nivel de AMP cíclico (AMPC), los preadipocitos entran en ciclo celular y en lo que se denomina expansión clonal mitótica. En esta fase se detecta un incremento en la expresión de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$ . La inducción de estas C/EBPs a su vez aumentan la expresión de C/EBP $\alpha$  y de el receptor activado por proliferadores peroxisomales  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), que activan la transcripción de los genes necesarios para la adquisición y el mantenimiento del fenotipo adipocítico (Darlington et al., 1998). Los ratones deficientes para C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  y PPAR $\gamma$  confirman que estas moléculas son necesarias para la adipogénesis *in vivo* (Wang et al., 1995, Tanaka et al., 1997, Barak et al., 1999, Rosen et al., 1999).

En la diferenciación mieloide también se produce una expresión de distintas C/EBPs (Scott et al., 1992). Los niveles de C/EBP $\beta$  son elevados durante la diferenciación de macrófagos (Natsuka et al., 1992, Ramji and Foka, 2002), y activa numerosos genes importantes para la completa maduración y funcionalidad de estas células como interleuquinas, lisozima, óxido nítrico sintetasa, CD11c, proteína inhibidora de macrófagos MIP-1 $\alpha$ , etc (Skalnik, 2002). El papel fundamental de C/EBP $\beta$  en estos procesos, se pone en evidencia en los ratones que carecen de C/EBP $\beta$ , ya que presentan defectos en la función de los macrófagos (Natsuka et al., 1992, Tanaka et al., 1995). También C/EBP $\beta$  está implicada en la diferenciación de progenitores de linfocitos B primarios de ratón a células mieloides (Stoilova et al., 2013).

Asimismo, se ha demostrado que C/EBP $\beta$  se requiere para la diferenciación de otros tipos celulares (Seagroves et al., 1998, Wang et al., 2012, Feng et al., 2008, Roos et al., 2012, Al-Adsani et al., 2010, Westmacott et al., 2006). En conjunto, estos datos sugieren que C/EBP $\beta$  juega un importante papel en la especificación del tipo celular.

- *Proliferación celular*: C/EBP $\beta$  juega un papel importante como regulador del balance entre proliferación y diferenciación en diversos tipos celulares. C/EBP $\beta$  regula la proliferación y regeneración hepática (Greenbaum et al., 1998, Orellana et al., 2010, Jakobsen et al., 2013), donde la fosforilación de C/EBP $\beta$  tiene un papel importante (Buck et al., 1999). C/EBP $\beta$  también ha sido implicada en apoptosis, aunque hay estudios que sugieren que podría funcionar como factor proapoptótico y otros como antiapoptótico. Por

un lado, C/EBP $\beta$  induce apoptosis en células de mieloma (Zhu et al., 1997), en progenitores hematopoyéticos (Muller et al., 1995) y es esencial para que se desencadene la muerte celular programada en hepatocitos (Mukherjee et al., 2001). Por otro lado, C/EBP $\beta$  previene la muerte celular en la línea celular de macrófagos BMDM (macrófagos derivados de médula ósea) (Wessells et al., 2004). Además, las hembras deficientes en C/EBP $\beta$  son estériles (Sterneck et al., 1997) y presentan anomalías en la proliferación y diferenciación de la glándula mamaria (Robinson et al., 1998).

En muchos tumores se ha observado que la expresión de C/EBP $\beta$  está aumentada o que su sobreexpresión en las mismas favorece la proliferación, sugiriendo que C/EBP $\beta$  podría favorecer la supervivencia y proliferación de las células tumorales (Aguilar-Morante et al., 2011). Se ha descrito también que en ratones deficientes para C/EBP $\beta$  existe una menor formación de tumores de piel (Zhu et al., 2002).

- *Control del metabolismo*: El papel clave de C/EBP $\beta$  en el control del metabolismo de hidratos de carbono y lípidos se pone claramente de manifiesto con el análisis del fenotipo de los animales carentes de dicho gen. Los ratones deficientes para C/EBP $\beta$  no expresan fosfoenolpiruvatocarboxikinasa, ni movilizan glucógeno hepático y aproximadamente un 40% mueren de hipoglucemia nada más nacer (Liu et al., 1999). El 60% restante sobreviven pero presentan hipoglucemia así como niveles más bajos de lo normal de ácidos grasos libres en plasma, triglicéridos y cuerpos cetónicos. Esto se ha atribuido principalmente a una disminución de la producción hepática de cAMP y de la actividad de la proteína quinasa A (Croniger et al., 2001, Liu et al., 1999, Ramji and Foka, 2002, Schrem et al., 2004). Estudios recientes, muestran que C/EBP $\beta$  aumenta la función mitocondrial y protege a los ratones de esteatosis hepática inducida por los receptores X del hígado (LXR) (Rahman et al., 2013).

- *Respuesta de fase aguda*: La respuesta de fase aguda es un mecanismo poco específico de defensa del organismo frente a infecciones por bacterias y virus, inflamación, neoplasias y diversos tipos de daño tisular. Implica la alteración de la concentración de diversas proteínas plasmáticas, proteínas de fase aguda, la mayoría de las cuales son producidas por el hígado. Los macrófagos detectan el daño y responden secretando, en el torrente sanguíneo, una batería de citoquinas pro-inflamatorias que desencadenan la activación o represión de los genes de fase aguda en el hígado. En la regulación de este proceso C/EBP $\beta$  juega un papel fundamental regulando la expresión de genes implicados en su

desarrollo (Yiangou et al., 2001, Arambasic et al., 2010). Esta respuesta a fase aguda se encuentra reducida en ratones deficientes en C/EBP $\beta$  (Screpanti et al., 1995).

- *Respuesta inflamatoria e inmune:* C/EBP $\beta$  desempeña un importante papel en los procesos inflamatorios y de respuesta inmune, de hecho se clonó como un factor de transcripción capaz de regular la expresión de IL-6 (Akira et al., 1990, Poli et al., 1990). C/EBP $\beta$  interacciona con NF-kB y regula sinérgicamente con este factor de transcripción diversas citoquinas y genes de fase aguda (Stein and Baldwin, 1993, Stein et al., 1993, Ray et al., 1995a, Ray et al., 1995b, Ray and Ray, 1995, Basak et al., 2005, Wang and Jiang, 2013, Takimoto et al., 2013).

Se ha descrito la presencia de sitios consenso para C/EBP $\beta$  en los promotores de numerosos genes proinflamatorios así como la regulación de su expresión (Lowenstein et al., 1993, Caivano et al., 2001, Straccia et al., 2011, Kocieda et al., 2012, Dentesano et al., 2012, Kim et al., 2013, Arensdorf and Rutkowski, 2013, Ugarte et al., 2013). Se ha demostrado también que el lipopolisacárido bacteriano (LPS) activa C/EBP $\beta$  y éste a su vez induce la expresión de algunos de estos genes en hepatocitos, macrófagos y células gliales (Cardinaux et al., 2000, Cardinaux and Magistretti, 1996, Tengku-Muhammad et al., 2000b, Bradley et al., 2003, Perez-Capote et al., 2006, Ejarque-Ortiz et al., 2007, Ye et al., 2012, Dlaska and Weiss, 1999, Wadleigh et al., 2000, Roos et al., 2012, Wang and Jiang, 2013, Chano and Descoteaux, 2002, Rahman et al., 2012) lo que indica la importancia que tiene este factor de transcripción en la respuesta inflamatoria e inmune. En este sentido, los ratones que carecen de C/EBP $\beta$  presentan una respuesta inmune alterada (Screpanti et al., 1995, Serrat et al., 2012).

#### **2.4. Papel de C/EBP $\beta$ en el Sistema Nervioso Central (SNC)**

Se ha demostrado que C/EBP $\beta$  tiene un papel muy importante en el SNC. C/EBP $\beta$  se expresa ampliamente tanto en cerebro adulto como durante el desarrollo (Nadeau et al., 2005), y tanto en células gliales como en neuronas (Ejarque-Ortiz et al., 2007, Sterneck and Johnson, 1998) y es el principal miembro de la familia C/EBP presente en el hipocampo (Yukawa et al., 1998, Cortes-Canteli et al., 2008). C/EBP $\beta$  se ha detectado en neuronas granulares y piramidales, en las neuronas inhibitorias del hipocampo y también es abundante en las células de Purkinje del cerebelo (Sterneck and Johnson, 1998).

Las funciones de C/EBP $\beta$  en el SNC son numerosas. Nuestro grupo ha demostrado que la sobreexpresión de C/EBP $\beta$  induce diferenciación neuronal que requiere la activación de la

vía PI3K (Cortes-Canteli et al., 2002). Menard y *col* definieron la ruta MERK-C/EBP como esencial para que los progenitores corticales se convirtieran en neuronas postmitóticas (Menard et al., 2002). Durante el desarrollo, la fosforilación de C/EBP $\beta$  tiene un papel importante en la diferenciación de precursores corticales a neuronas o astroglia de manera dependiente de MERK-ERK (Paquin et al., 2005). C/EBP $\beta$  también está implicada en la señalización por neurotrofinas. La inducción del fenotipo neuronal en la línea celular PC12 por NGF (factor de crecimiento nervioso) requiere de la activación de C/EBP $\beta$  (Sterneck and Johnson, 1998). Más recientemente, utilizando ratones deficientes para esta proteína, nuestro laboratorio ha demostrado que C/EBP $\beta$  tiene un papel importante en el mantenimiento de la neurogénesis que tiene lugar en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo en ratones adultos (Cortes-Canteli et al., 2011).

C/EBP $\beta$  está también implicada en procesos de memoria y aprendizaje, de hecho su papel es fundamental en estos procesos. El primer estudio que implica a miembros de la familia C/EBP en este proceso, lo llevó a cabo el grupo de Eric Kandel en el molusco *Aplysia* (Alberini et al., 1994). Observaron que la inducción de la expresión del factor de transcripción homólogo a C/EBP en este invertebrado, *Aplysia* C/EBP (ApC/EBP), era imprescindible para la consolidación de la memoria a largo plazo del reflejo de retirada del sifón. Este aprendizaje se inhibía selectivamente al bloquear la expresión o la actividad de ApC/EBP (Alberini et al., 1994, Lyons et al., 2006). Este papel de las C/EBPs en la memoria a largo plazo se confirmó más tarde en mamíferos, particularmente en el caso de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  (Sterneck and Johnson, 1998, Taubenfeld et al., 2001a, Taubenfeld et al., 2001b, Chen et al., 2003, Yefet et al., 2006, Merhav et al., 2006). Se demostró que C/EBP $\beta$  tiene una función esencial en el hipocampo durante la fase de consolidación de la memoria ya que ratas carentes de C/EBP $\beta$  presentaban menor memoria retentiva. Durante estos procesos de aprendizaje, la expresión de C/EBP $\beta$  va muy unida a la de CREB, otro factor de transcripción esencial en ellos. Se ha demostrado que, en neuronas hipocampales de rata donde la expresión y la capacidad de unión al DNA de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  se inducen en respuesta a AMPc y Ca<sup>2+</sup>, CREB induce la expresión de C/EBP $\beta$ . Se ha observado también que C/EBP $\beta$  colocaliza con CREB-fosforilado en poblaciones neuronales de hipocampo, y que su activación en este proceso es inhibida por lesiones que bloquean la consolidación de la memoria (Taubenfeld et al., 2001a, Taubenfeld et al., 2001b).

Como hemos comentado anteriormente, C/EBP $\beta$  se expresa en células gliales, astrocitos y microglía, y su expresión aumenta en procesos inflamatorios y tras un daño neurológico. C/EBP $\beta$  se induce por IL-1 $\beta$ , LPS, estaurosporina, ácido kaínico (AK), TNF- $\alpha$  y HIV-1 (Cardinaux et al., 2000, Cortes-Canteli et al., 2008, Straccia et al., 2011, Fields et al., 2011, Albertini et al., 1998). En astrocitos, la activación de C/EBP $\beta$  promueve el metabolismo del glucógeno (Cardinaux and Magistretti, 1996), y en astrocitos y microglía activados se produce una sobreexpresión de C/EBP $\beta$  la cual induce la expresión de genes pro-inflamatorios (Yi et al., 2007, Jana et al., 2005). En cultivos mixtos de células gliales/neuronas la expresión de C/EBP $\beta$  se induce por el tratamiento con LPS (inflamación) o ácido kaínico (AK, excitotoxicidad). Estos resultados sugieren que C/EBP $\beta$  tiene un importante papel en la activación glial, pero solo cuando está involucrada una reacción inflamatoria o excitotóxica, sugiriendo un papel importante de C/EBP $\beta$  en neuroinflamación (Perez-Capote et al., 2006). Con relación a esto, se sabe también que en ausencia de C/EBP $\beta$ , la expresión de genes proinflamatorios y los efectos neurotóxicos de la microglía reactiva están atenuados (Straccia et al., 2011).

Mediante análisis de microarrays con células neurales que sobreexpresan C/EBP $\beta$ , nuestro grupo ha encontrado que esta proteína induce la expresión de genes implicados en procesos inflamatorios y de daño neural (Cortes-Canteli et al., 2004) y, más recientemente, hemos demostrado que ratones carentes en C/EBP $\beta$  muestran una reacción inflamatoria y actividad glial reducida y una menor muerte neuronal en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo en respuesta a un daño excitotóxico (Cortes-Canteli et al., 2008). En ese trabajo se muestra que C/EBP $\beta$  regula la expresión de genes implicados en procesos inflamatorios y daño cerebral como interleuquina 1 $\beta$  y COX-2. Estos datos indican una función clave de C/EBP $\beta$  en las rutas que conducen a un daño neuronal mediado por un proceso excitotóxico y sugieren que este factor de transcripción podría constituir una nueva diana terapéutica en neuroprotección. Otros estudios indican que ratones deficientes para C/EBP $\beta$  desarrollan menos infartos cerebrales y menor apoptosis neuronal después de oclusión de la arteria cerebral media (OACM) (Kapadia et al., 2006, Rininger et al., 2012). Estos resultados indican que la ausencia de C/EBP $\beta$  induce neuroprotección frente a daño excitotóxico e isquemia. Hay también estudios que sugieren que C/EBP $\beta$  puede estar implicada en enfermedades neurodegenerativas, aunque su papel no está claro. En esclerosis lateral amiotrófica (ELA) C/EBP $\beta$  regula la expresión de genes neurotóxicos en las células microgliales (Valente et al., 2012). En un estudio en el que analizan la expresión

de diferentes genes en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer, observaron un fuerte aumento en los niveles de C/EBP $\beta$  (Colangelo et al., 2002), sin embargo otro estudio más reciente indica que las placas amiloides bloquean la expresión de C/EBP $\beta$  (Samuelsson et al., 2008). Por tanto la clarificación del papel de C/EBP $\beta$  en este tipo de patologías es controvertida y necesita de más estudios.

### 3. El sistema del complemento

El sistema del complemento está compuesto por aproximadamente 30 proteínas que representan casi el 5% del total de las proteínas del suero, y una baja proporción de proteínas de membrana. Son varios los sitios donde se sintetizan los diferentes componentes del complemento. El hígado es el principal productor, pero también se producen en bazo, células del epitelio intestinal, fibroblastos y macrófagos activados que los producen en focos inflamatorios. Algunos de los componentes del sistema del complemento se denominan con la letra “C” y con un número que se refiere a la cronología de su descubrimiento. Entre sus componentes hay diversas proteasas que en estado basal son inactivas y se activan por proteólisis (zimógenos), y también hay inhibidores, activadores y receptores para dichas proteínas. Tras la rotura proteolítica de un componente del complemento se denomina “b” al fragmento mayor y “a” al fragmento más pequeño. Estas proteínas forman una cascada capaz de dar una respuesta muy rápida y amplificada frente a un estímulo desencadenante. El sistema del complemento está implicado en la defensa frente a infecciones y procesos tumorales y es clave en la iniciación de la inflamación (Song et al., 2000, Flierl et al., 2013). La activación del complemento estimula la respuesta inmune innata y adaptativa, promueve la fagocitosis, facilita la lisis de células y microorganismos (Frank and Fries, 1991), y elimina células alteradas, como células apoptóticas y restos celulares, para proteger contra la autoinmunidad (Ricklin et al., 2010). La respuesta inflamatoria es fundamental para que la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, pueda ser eficaz. Las funciones del complemento se pueden dividir en (Gasque, 2004):

*Acción citolítica:* Lisis de células sobre cuyas membranas se han adosado complejos del complemento. La lisis se produce por la formación de poros MAC (Membrane Attack Complex/complejo de ataque a la membrana) formados por el complejo C5b6789.

*Acción anafilotóxica:* La llevan a cabo ciertas fracciones del complemento como C3a y C5a, que son solubles, actúan como ligandos de receptores de membrana y poseen una



potente acción activadora sobre mastocitos y basófilos que en consecuencia liberan mediadores de la inflamación como la histamina. Las sustancias vasoactivas liberadas aumentan la permeabilidad capilar, lo que facilita la afluencia de macrófagos y microglía en la zona dañada (Nordahl et al., 2004, Klos et al., 2009, Zhou, 2012)

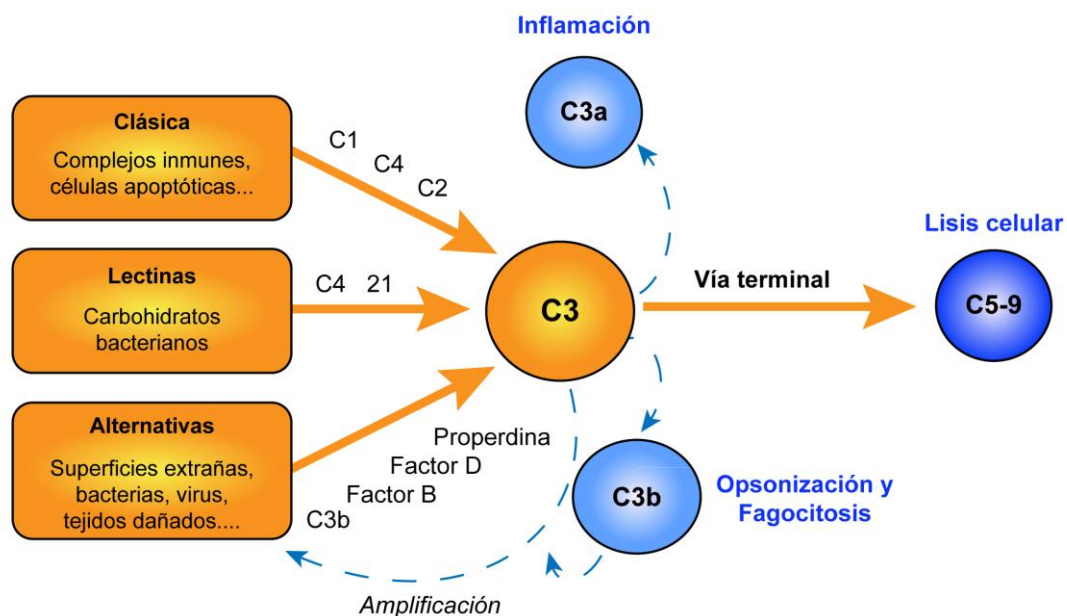
**Acción quimiotáctica:** Las fracción C5a posee una potente actividad quimiotáctica, que atrae los leucocitos al foco inflamatorio.

**Acción facilitadora de la fagocitosis (opsonización):** Durante la activación del complemento se genera C3b, que queda fijado en la superficie de microorganismos, y facilita su reconocimiento y fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos. Existen cuatro receptores para fragmentos de C3b en los leucocitos cuya deficiencia determina una mayor susceptibilidad a padecer infecciones recurrentes. Este es posiblemente el mayor mecanismo de defensa frente a las infecciones bacterianas (Zhou, 2012, Nordahl et al., 2004).

**Acción neutralizadora de virus:** La unión de proteínas del complemento a la superficie vírica bloquea la entrada del virus. Además esta unión facilita la fagocitosis del virus como ocurre en la opsonización bacteriana.

**Aclaramiento de inmunocomplejos:** Los complejos antígeno-anticuerpo que circulan en sangre pueden ser nocivos, ya que al precipitar activarían el complemento e iniciarían un foco inflamatorio. La unión de C3b a estos inmunocomplejos los disgrega, y facilita su retirada de la circulación.

El sistema del complemento es activado de 3 maneras diferentes o vías de activación que son la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas (**Figura 4**). Todas ellas llevan a la activación del componente C3 y a partir de ahí la vía es común para todas ellas, finalizando en la vía lítica (Murphy KP and Janeway C, Janeway's Immunobiology; Tizard IR, 2009, Inmunología veterinaria).



**Figura 4. Activación del sistema del complemento.** Hay tres vías de activación del complemento, la vía clásica que es desencadenada por complejos antígeno-anticuerpo, células apoptóticas, etc ; la vía de las lectinas, desencadenada por carbohidratos bacterianos y la vía alternativa, desencadenada directamente en la superficie de patógenos, tejidos dañados, etc, y sirve como un sistema de amplificación de las vías clásica y de lectinas. Tras reacciones en cascada donde están implicados diferentes componentes del complemento, las tres vías convergen en la “convertasa de C3” que rompe C3, generando C3a y C3b. C3a induce el reclutamiento de células inmunes y la respuesta inflamatoria. C3b se une covalentemente a superficies de células cercanas, opsoniza las células para su fagocitosis, inicia las reacciones que llevan a la formación del complejo de ataque a las membranas (C5-9), o inicia de nuevo la vía alternativa. Modificado de (Lynch et al., 2012).

### **3.1. El sistema del complemento en el SNC**

#### **3.1.1. Expresión de componentes del complemento en el cerebro**

En condiciones normales los componentes del complemento no pasan la barrera hematoencefálica. Sin embargo, se encuentran en el cerebro ya que hay una producción local de los mismos (Gasque et al., 2000, van Beek et al., 2003). Tanto células gliales como neuronas son capaces de producir diversos componentes del complemento y esta producción aumenta en respuesta a un daño neural o señales inflamatorias (Levi-Strauss and Mallat, 1987, Walker and McGeer, 1992, Gasque et al., 1995, Gasque et al., 1993, Veerhuis et al., 2011, Stahel and Barnum, 1997, Humayun et al., 2009, Gavrilyuk et al., 2005). Los astrocitos y la microglía son los mayores productores del complemento tanto en condiciones normales como patológicas. La microglía expresa altos niveles de diversos receptores del complemento cruciales para inducir la fagocitosis de estructuras marcadas por el complemento, la regulación de señales de citoquinas y la quimiotaxis. Los astrocitos expresan altos niveles de C3 y otras proteínas de la cascada del complemento (Levi-Strauss and Mallat, 1987, Cahoy et al., 2008). Las neuronas son capaces de sintetizar componentes del complemento principalmente en situaciones patológicas y tras un daño en el SNC (Woodruff et al., 2010, Veerhuis et al., 2011). En humanos, se ha observado la presencia de diversos mRNA para algunas de estas proteínas en corteza e hipocampo, y se ha observado también un aumento en muestras de pacientes con enfermedad de Alzheimer, sobre todo en neuronas piramidales (Shen et al., 1997). Los oligodendrocitos también son una fuente de componentes del complemento en cerebro (Wren and Noble, 1989, Piddlesden et al., 1994) y a través de él pueden contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias del SNC, como enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple (Hosokawa et al., 2003, Schwab and McGeer, 2002).

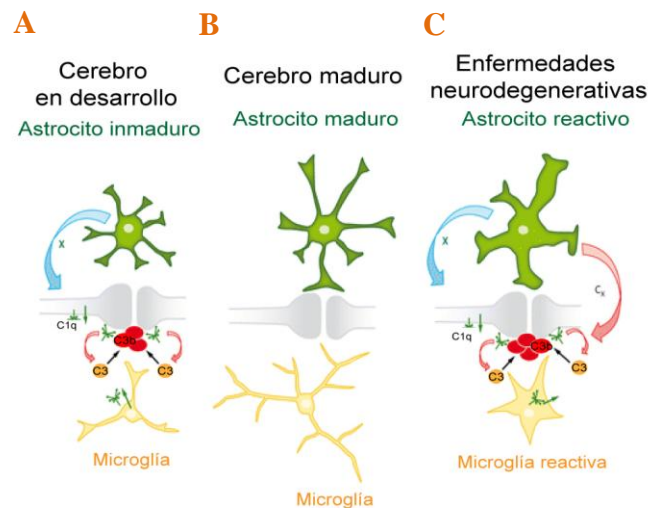
### **3.1.2. Funciones del complemento en el SNC en condiciones normales (no patológicas).**

La síntesis local de proteínas del complemento es crítica para la defensa del cerebro (neuroprotección) frente a diversos daños y para su correcto funcionamiento (Mastellos et al., 2005) (Francis et al., 2003). Por otro lado, se han descrito nuevas funciones del complemento en el cerebro que van más allá de la neuroprotección, como son la neurogénesis y la remodelación y plasticidad sináptica durante el desarrollo (Ricklin et al., 2010, Rutkowski et al., 2010b, Rutkowski et al., 2010a, Stevens et al., 2007, Furgeaud and Boulanger, 2007, Veerhuis et al., 2011, Benoit and Tenner, 2011, Stephan et al., 2012). En este último caso, el complemento podría “determinar” aquellas sinapsis que han de ser eliminadas en ese proceso. De acuerdo con esta hipótesis, ratones carentes de dos proteínas del complemento, C1q y C3, muestran defectos en el correcto establecimiento de sinapsis durante el desarrollo del sistema visual (Stevens et al., 2007). Por el contrario, una activación del complemento inapropiada (por ejemplo una infección durante el desarrollo) podría alterar la conectividad neural por eliminación de sinapsis necesarias para un correcto desarrollo del cerebro. En este sentido, se ha sugerido que la activación anormal de la cascada del complemento por infecciones durante el embarazo puede favorecer el desarrollo de autismo o esquizofrenia en la descendencia (Pardo et al., 2005, Meyer et al., 2011, Morgan et al., 2010, Hashimoto, 2008, Monji et al., 2009).

### **3.1.3. Papel del complemento en el SNC en situaciones patológicas**

Se ha descrito que el sistema del complemento está implicado en numerosas patologías del SNC. Por ejemplo se ha observado una mejor recuperación en ratones deficientes en C3 tras isquemia cerebral (Cervera et al., 2010, Mocco et al., 2006c, Mocco et al., 2006a, Mocco et al., 2006b). También se ha observado que el sistema del complemento puede contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Morgan et al., 1997b, Morgan et al., 1997a). Una activación excesiva del complemento, asociada con una activación glial y liberación de compuestos pro-inflamatorios, parece estar implicada en la pérdida sináptica asociada tanto al normal declive cognitivo del envejecimiento como a patologías del SNC (Stephan et al., 2012) (**Figura 5**). Esta pérdida de actividad sináptica es un fenómeno que se produce en etapas tempranas de enfermedades neurodegenerativas (Selkoe, 2002, Mallucci, 2009, Walker and Tesco, 2013). En humanos, se ha observado un aumento de diversas proteínas del complemento

en diferentes regiones del cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Shen et al., 1997, Aiyaz et al., 2012, Proitsi et al., 2012), esclerosis múltiple (Prineas and Parratt, 2012), Huntington (Leblhuber et al., 1998), Parkinson (Wang et al., 2011), y enfermedad de Niemann-Pick (Lopez et al., 2012). Este papel del complemento en la patología de diversas enfermedades neurodegenerativas abre nuevas vías para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de este tipo de enfermedades.



**Figura 5. Funciones del complemento en el SNC.** (A) En el cerebro en desarrollo se ha propuesto que los astrocitos inducen la producción de C1q en las neuronas a través de un mediador desconocido (X) y que C1q tras su activación por la vía clásica señala sinapsis superfluas para su eliminación por la microglía. (B) En ausencia de la activación del complemento las sinapsis permanecen estables. (C) En situaciones patológicas se ha propuesto que los astrocitos reactivos provocarían vía inducción de C1q un exceso de pérdida de sinapsis y la consiguiente progresión de la neurodegeneración. Modificado de (Stephan et al., 2012).

#### 4. Componente 3 del complemento

El componente 3 del complemento (C3) es la proteína más abundante del mismo (Muller-Eberhard and Nilsson, 1960) y, como ya hemos comentado, es un componente clave en la cascada del complemento. En él convergen las tres vías de activación descritas en el apartado 3, inicia la parte final de la cascada promoviendo la inflamación, la eliminación de patógenos y facilitando la respuesta inmune. C3 es el componente del complemento más versátil y posee características estructurales que le permiten interactuar con un gran número de otros factores del complemento como proteasas, receptores y reguladores así como proteínas que no pertenecen al complemento como proteínas virales y bacterianas (por ejemplo, proteína Sbi de *Staphylococcus aureus*). Estas características son necesarias para llevar a cabo varias de sus funciones, como el marcaje de células o restos celulares para su posterior eliminación. El hígado es el principal

productor de C3, aunque también lo producen monocitos y macrófagos. Su concentración sérica llega a incrementarse en un 50% en la fase aguda de procesos inflamatorios (Barnum et al., 1990), se considera por tanto, una proteína de fase aguda. El gen humano de C3 está en el cromosoma 19 (Whitehead et al., 1982), tiene un tamaño de 42 kb y 41 exones (Fong et al., 1990), en ratón se encuentra en el cromosoma 17 (Natsuume-Sakai et al., 1978) y en rata en el 9. La homología de secuencia entre humano y ratón es de un 79% a nivel de nucleótidos, y de un 77% a nivel de aminoácidos (de Bruijn and Fey, 1985). El gen de C3 origina 18 RNAs mensajeros, pero solo 5 dan lugar a proteínas.

C3 pertenece a la familia de las alfa 2 macroglobulinas ( $\alpha_2M$ ). La prepro-C3, tiene 1663 aminoácidos y tiene un peso molecular de 185 kDa (Tack and Prahl, 1976, de Bruijn and Fey, 1985). Posteriormente la proteína pro-C3 sufre varias modificaciones post-traduccionales. La convertasa furina b (Bednarczyk and Capra, 1988, Misumi et al., 1991) elimina una secuencia de 4 argininas (Arg 646-649) originando dos cadenas,  $\alpha$  (residuos 650-1641) y  $\beta$  (residuos 1-645), unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas 559 y 816 (Dolmer and Sottrup-Jensen, 1993, Gros et al., 2008). Y finalmente, antes de ser secretada, C3 es glicosilada en el aparato de Golgi en dos residuos de asparagina que están en la posición 917 de la cadena  $\alpha$ , y 63 de la cadena  $\beta$  (Hase et al., 1985, Hirani et al., 1986). C3 se activa en el medio extracelular por rotura proteolítica (entre los residuos Arg726-Ser727) por la C3 convertasa dando lugar a dos fragmentos activos, la anafilotoxina C3a (9 KDa) y el fragmento C3b (177 KDa). C3b tiene expuestos dominios de unión (ocultos en C3) para otros componentes del complemento (Lambris, 1988).

Una de las características más importantes de C3 es que tras su activación, C3b se une covalentemente a moléculas aceptoras cercanas al punto de activación, fundamentalmente superficies celulares (Law and Dodds, 1997, Pangburn et al., 1983). Esta propiedad de C3b deriva de un enlace tioester, muy reactivo, que se forma por modificación post-traducciona (Tack et al., 1980) entre la cys 988 y la gln 991 y que está protegido en el interior de C3 pero que en C3b se expone al exterior reaccionando rápidamente con grupos alcohol ó amino formando el correspondiente enlace éster o amida (Janssen et al., 2006). Las células a las que se une C3b son marcadas para su destrucción esto es, para iniciar la vía terminal que lleva a la lisis celular, para su fagocitosis por macrófagos o para su unión con células B estimulando así la respuesta inmune (Sahu and Lambris, 2001).

#### 4.1. Papel de C3 en el SNC

Como hemos indicado en el apartado 1, además de su implicación en procesos inflamatorios y de defensa inmunológica, el complemento, y en concreto C3, podría estar implicado en el SNC en otras funciones específicas del mismo. En este apartado analizaremos detalladamente dichas funciones.

**4.1.1. Neurogénesis:** Se ha observado que el receptor de C3a (C3aR) se expresa en células madre neurales *in vitro* e *in vivo* y podría tener un papel importante en neurogénesis. De hecho estudios realizados en ratones adultos muestran que aquellos con una menor expresión de este receptor presentan menor neurogénesis tras un proceso isquémico (Rahpeymai et al., 2006). La interacción C3a-C3aR es, por tanto, un regulador positivo de la neurogénesis adulta que sigue al daño isquémico (Shinjyo et al., 2009). También se ha observado que CR2, un receptor de fragmentos activados de C3, se expresa en células neurales progenitoras presentes en el giro dentado y regula neurogénesis en hipocampo de adulto. Al contrario de lo comentado anteriormente, un aumento en los niveles de ligandos para este receptor, como C3d, asociado a procesos de daño cerebral o infecciones podría disminuir la neurogénesis hipocampal (Moriyama et al., 2011).

**4.1.2. Remodelación sináptica:** C3 es un factor importante en la remodelación sináptica durante el desarrollo, ya que marcaría las sinapsis que se han de eliminar durante este proceso (Zipfel and Skerka, 2009). Los datos más claros de la implicación de C3 en el desarrollo provienen del estudio de animales deficientes para C3 y CR3. Estos ratones presentan un sistema visual defectuoso debido a un defecto en el proceso de eliminación de las conexiones sinápticas inapropiadas durante el desarrollo (Stevens et al., 2007, Schafer et al., 2012). La microglía juega un papel esencial en este proceso (Ransohoff and Stevens, 2011, Ransohoff, 2011, Tremblay, 2011, Tremblay et al., 2011, Tremblay and Majewska, 2011) ya que son las únicas células residentes del cerebro que expresan CR3 (necesario para la eliminación de restos opsonizados por C3b) y son clave en la eliminación de sinapsis inadecuadas (Graeber and Streit, 2010, Graeber, 2010).

#### 4.1.3. Papel de C3 en patologías del SNC:

- **Enfermedades neurodegenerativas:** Se ha observado que una activación y un aumento en los niveles de expresión de C3 en el cerebro está implicada en procesos como inflamación y neurodegeneración que acompañan a diversas enfermedades tanto agudas (traumatismos, isquemia, etc) como crónicas (enfermedades neurodegenerativas) del cerebro (Terai et al., 1997, Stoltzner et al., 2000, McGeer and McGeer, 2002c, McGeer and McGeer, 2002d,

McGeer and McGeer, 2002a, McGeer and McGeer, 2002b). Por ejemplo se han observado niveles elevados de C3 en la enfermedad de Alzheimer. Pacientes con esta patología presentan niveles elevados de C3 en el líquido cefalorraquídeo que aumentan a medida que avanza la enfermedad (Wang et al., 2011). Zanjani y col. mostraron que C3 está presente alrededor de las placas amiloideas en estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer (Zanjani et al., 2005), una etapa en la que la pérdida sináptica conduce a la neurodegeneración, por lo que puede que la presencia del complemento en las sinapsis puede provocar la pérdida de estas estructuras mediada por las células de microglía. En resumen, estos resultados apoyan la idea de que la activación sináptica de la cascada del complemento, y de una manera importante C3, puede contribuir al progreso de la enfermedad por la eliminación de sinapsis. En el caso de la enfermedad de Parkinson, no está claro si hay una alteración de C3 (Finehout et al., 2005, Guo et al., 2009, Loeffler et al., 2006, Le et al., 2001, Wang et al., 2011), aunque se ha sugerido que C3a podría estar implicado mediante la activación de la microglía y producción de agentes oxidantes y proinflamatorios que contribuyen a la neurodegeneración característica de esta enfermedad (Le et al., 2001). Un estudio proteómico de proteínas séricas de pacientes con la enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiple, mostró que C3 era un buen biomarcador para estas enfermedades, ya que los pacientes enfermos presentaban niveles más elevados de C3c y C3dg en comparación con los sanos (Goldknopf et al., 2006). Se ha observado también niveles elevados de C3c en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple (Annunziata and Volpi, 1985)

- *Isquemia*: La deficiencia de C3 en ratones está asociada con un menor daño tras un derrame cerebral agudo en modelos de isquemia cerebral transitoria (Mocco et al., 2006a, Mocco et al., 2006c). Por el contrario la sobre-expresión de C3 está directamente relacionada con un aumento del estrés oxidativo después de una isquemia cerebral transitoria en ratones. El antioxidante *alfa-fenil-N-terbutil nitrona*, que es un neuroprotector en isquemia, inhibe la activación de C3, reduce el volumen del área infartada y las deficiencias neurológicas (Yang et al., 2013).

- *Traumatismo cerebral*: La activación del complemento contribuye al daño secundario en el traumatismo cerebral. Varios estudios han mostrado que pacientes con traumatismo cerebral presentan niveles elevados de C3 que contribuyen al daño secundario (Kossmann et al., 1997). Ratones KO para C3 muestran menor edema cerebral, menos infiltración de células inmunes y menos microglía activa alrededor del coágulo que sigue al trauma, en

comparación con los ratones Wt, sugiriendo que C3 es un importante factor que causa daño tras isquemia (Sewell et al., 2004, Yang et al., 2006b, Yang et al., 2006a).

- *Epilepsia*: En pacientes con epilepsia se ha observado una activación del complemento con niveles elevados de C3 en hipocampo y en corteza, y se ha sugerido que ello contribuye al desarrollo de los ataques epilépticos y a epileptogénesis (Jamali et al., 2006, Jamali et al., 2010, Aronica et al., 2007, van Gassen et al., 2008). Ratones deficientes para C3 son menos propensos al desarrollo de epilepsia (Libbey et al., 2010). En ratones inyectados con pilocarpina (uno de los modelos experimentales de epilepsia de lóbulo temporal más ampliamente utilizados), se ha descrito un aumento de la expresión de C3 a las 48 horas, 1 semana y 4 meses. Este aumento tiene lugar fundamentalmente en astrocitos del hilus del giro dentado del hipocampo. Se ha observado que esta activación de C3 está dentro de las áreas del cerebro que presentan mayor daño después de un status epilepticus, lo que parece indicar una relación entre los niveles de C3 y la severidad de la condición epiléptica (Kharatishvili et al., 2013). En humanos, se han descrito diversos polimorfismos en el promotor de C3 que podrían jugar algún papel en la susceptibilidad genética a padecer epilepsia del lóbulo temporal (Jamali et al., 2010).





## Objetivos



- Identificación de genes regulados por el factor de transcripción C/EBP $\beta$  en el hipocampo de ratón mediante análisis de microarray utilizando RNA de animales C/EBP $\beta^{+/+}$  (Wt) y C/EBP $\beta^{-/-}$  (KO).

- Una vez identificado el gen del componente 3 del complemento (C3) como un gen diferencialmente expresado en ratones C/EBP $\beta^{-/-}$  y dada su posible relevancia en daño neural analizamos detalladamente su regulación por C/EBP $\beta$  y su posible papel mediador del efecto de C/EBP $\beta$  en dicho daño, para lo cual nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

- Análisis de la expresión del gen componente 3 del complemento (C3) y su regulación por C/EBP $\beta$  en modelos *in vitro* de daño neural.

- Análisis *in vitro* de la implicación de C3 en procesos inflamatorios (tratamiento con LPS) o excitotóxicos (tratamiento con glutamato) .

- Estudio del mecanismo de regulación de C3 por C/EBP $\beta$  mediante el análisis de su promotor.

- Regulación de la expresión de C3 *in vivo* y estudio de su papel después de un daño excitotóxico.

- Identificación y caracterización de los tipos celulares que expresan C3 en el hipocampo de ratón y rata tras daño neural.





# **Materiales y Métodos**



## 1. Análisis de microarray

El estudio se realizó en la unidad de genómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Para ello aportamos 2,0µg de RNA total de 14 muestras de hipocampo de ratón: 7 de ratones C/EBPβ<sup>+/+</sup> y 7 de ratones C/EBPβ<sup>-/-</sup>. La extracción de RNA se llevó a cabo como se describe en el apartado 2 de materiales y métodos. Los chips fueron escaneados usando Agilent G2567AA Microarray Scanner System (Agilent Technologies). Se realizaron un total de 14 arrays y se analizaron 45018 genes con el software Agilent G2567AA Feature extraction 9.1.3.1. El procesamiento de los datos consistió en el ajuste por filtrado por calidad de sonda, ajuste de background, normalización por quantiles y obtención de la mediana de sondas no-control replicadas. Los datos se filtraron de forma no específica, eliminando genes que no mostraron variabilidad y que se consideraron en un primer momento como no diferencialmente expresados, llegando al análisis de 2463 genes. Al final del proceso, se detectaron 33 genes diferencialmente expresados entre los dos grupos experimentales de ratones (C/EBPβ<sup>+/+</sup> y C/EBPβ<sup>-/-</sup>) con un *p-value* corregido por test múltiple (método BH) de 0,35, de los cuales 17 genes estaban sobreexpresados y 16 tenían reducida su expresión en C/EBPβ<sup>+/+</sup>.

## 2. RT-PCR cuantitativa

El RNA total de hipocampo de ratón C/EBPβ<sup>+/+</sup> y C/EBPβ<sup>-/-</sup> para C/EBPβ, fue extraído mediante TRIzol (Invitrogen) y a continuación la contaminación por DNA genómico fue eliminada mediante el tratamiento con DNAsa. Para generar su correspondiente DNA complementario (cDNA) se partió de 1µg de RNA total y se retro-transcribió utilizando el kit *Superscript III* (Invitrogen).

Los cebadores utilizados para confirmar por RT-PCR la diferencia de expresión génica del gen C3 entre ratones C/EBPβ<sup>+/+</sup> y C/EBPβ<sup>-/-</sup> se presentan en la **Tabla I**.

Nombre	Directo (5'-3')	Reverso (5'-3')
C3	ACC TTA CCT CGG CAA GTT TCT	TTG TAG AGC TGC TGG TCA GG

**Tabla I.** Cebadores utilizados para la realización de RT-PCR del gen C3.

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos y los niveles de RNA mensajero, fueron medidos en el aparato ABI PRISM 7700 *Sequence Detector*

(Applied Biosystem) utilizando SYBRgreen (Applied Biosystem) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA ribosomal 18S se utilizó como gen de referencia y para calcular la expresión relativa de cada gen se usó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los DNAs complementarios fueron cargados por triplicado para cada uno de los cebadores empleados.

### 3. Clonaje del promotor del gen C3 de ratón en el plásmido pGL4.10

Se amplificaron distintos fragmentos del promotor de C3 de ratón por PCR a partir de DNA de ratón mediante cebadores específicos tal como se muestra en la Tabla II. Todos los fragmentos se subclonaron en el plásmido linearizado pCRII (permite una ligación directa del producto de PCR en el plásmido), mediante el kit *Dual Promoter TA Cloning* (Invitrogen), y se transformaron en bacterias *E.coli*. Las colonias de los plásmidos recombinantes que contienen los productos de PCR se analizaron por digestión con *Kpn I* y *Xho I* y aquellos clones que fueron positivos para la digestión se secuenciaron con los oligonucleótidos universales M13 *reverse* y M13 *forward*. Aquellas secuencias sin mutaciones, fueron clonadas entre los sitios *Kpn I* y *Xho I* del plásmido reportero pGL4.10 que contiene como gen testigo el gen de la luciferasa, obteniéndose las construcciones PC3/1711 (-1669/+42), PC3/297 (-255/+42) y PC3/121 (-79/+42), respectivamente.

Directo (5'-3')	Reverso (5'-3')	Región amplificada
GGAGAACAATACAGAGAGGAGG	AGTGAAGGAAAAAGGTGGAAG	-1669/+42 (1711 pb)
GGACCAGCCCAGGTTTCAGCA	AGTGAAGGAAAAAGGTGGAAG	-255/+42 (297 pb)
TGCAGGAACAGGGAGGGACCA	AGTGAAGGAAAAAGGTGGAAG	-79/+42 (121 pb)

**Tabla II.** Cebadores utilizados para el clonaje del promotor del gen C3 de ratón y sus delecciones, en el plásmido reportero pGL4.10.

### 4. Mutagénesis dirigida

Las mutaciones del promotor de C3 se realizaron mediante el kit de mutagénesis *QuickChange Site-Directed* (Stratagene). Se mutaron dos posibles sitios de unión de C/EBP $\beta$  localizados mediante el programa informático *Mat Inspector* (*Genomatix*). Sitio A situado entre los nucleótidos -616/-599) y el sitio B situado entre los nucleótidos -108/-94). Los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis se muestran en la **Tabla III** (se indica solamente el cebador directo). El producto de amplificación se digirió durante una hora a



37° C con la endonucleasa *Dpn I* capaz de eliminar el ddNA parental que esta metilado y deja intacto el DNA obtenido de la amplificación con las mutaciones deseadas que carece de grupos metilos. Posteriormente se utilizó el DNA obtenido para transformar células *E. coli*. Las construcciones correctas, aquellas que incorporaron la mutación deseada (PC3/MutA y PC3/MutB) se utilizaron para el estudio de la funcionalidad del promotor.

Nombre	Sitio de unión de C/EBPβ	Directo (5'-3')
PC3/Mut A	Sitio A	--AAGTAGGGC <b>cc</b> GGGT <b>cc</b> TGCCCAGCAACTGA---
PC3/Mut B	Sitio B	--CTTAGGAAAC <b>gcacaatgtctcaag</b> TGGGCAGTCCC---

**Tabla III.** Cebadores utilizados en la mutagénesis dirigida del promotor del gen C3. En minúscula se muestran las mutaciones realizadas.

## 5. Transfecciones transitorias

Las células GL261 se transfectaron de manera independiente en placas de 24 pocillos con *lipofectamine 2000* y 1,5 µg de las distintas construcciones reportero descritas anteriormente (P.C3/1711, P.C3/297, P.C3/121, P.C3/MutA y P.C3/MutB).

Como control interno de la eficiencia de transfección se utilizó el plásmido reportero pCMV-β-gal (Clontech) (0.01 µg) que contiene el gen testigo β-galactosidasa (β-gal) bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV).

El vector de expresión utilizado para el estudio de la regulación del promotor de C3 en ratón fue pcDNA3-C/EBPβ (pcDNA3β, 2 µg), que contiene el promotor del citomegalovirus (CMV) y el cDNA del gen C/EBPβ (Cortes-Canteli et al., 2002). La actividad luciferasa se midió utilizando el kit *luciferase assay system* (Promega) y la actividad β-galactosidasa con el reactivo *Beta-Glo Assay System* (Promega), en el luminómetro Glomax 96-*microplate Reader* (Promega). La actividad luciferasa se normalizó por la actividad β-galactosidasa (Luc/β-gal). Todos los experimentos se repitieron, al menos, tres veces en cuádruplicado.

## 6. Silenciamiento de C3 utilizando RNA de interferencia

La interferencia de C3 se llevo a cabo transfectando transitoriamente astrocitos de ratones C57 sembrados en placas de 60 mm con el *RNA short interference* (siRNA) de C3. Tanto el siRNA C3 como el siRNA control (siRNA Ctrl), ambos obtenidos de Santa Cruz

Biotechnology, se utilizaron a una concentración final de 150 pmoles en placa. Tras 24 horas de la transfección, las placas controles e interferidas para C3 fueron tratadas con LPS a una concentración de 10 µg/ml. A las 72 horas desde la transfección todas las placas se lavaron dos veces con PBS 1x frío y fueron procesadas para la extracción de proteína.

## 7. Infección lentiviral

Para inhibir la expresión de C/EBPβ se utilizó una secuencia de DNA que codifica un short hairpin RNA (shRNA) que se clonó en un vector lentiviral pGreenPuro (System Biosciences) bajo el control del promotor H1. La secuencia de interferencia seleccionada para C/EBPβ fue: 5'- GAGCGACGAGTACAAGATG – TCAAGAGACATCTTGTACTCGTCGTCGCTCTT - 3' y la secuencia control corresponde al *luciferase control shRNA* (shRNA Ctrl), el cual contiene la secuencia de interferencia para el gen Luciferasa clonada en el vector pGreenPuro. Las partículas lentivirales se obtuvieron en células HEK293T (células inmortalizadas embrionarias de ratón) las cuales se transfectaron de manera independiente con *lipofectamine 2000* en placas de 100 mm con los vectores lentivirales anteriores (5µg de cada uno) y con los vectores lentivirales de tercera generación específicos (**Tabla IV**): 1,75µg de pMD2-G, 3,25µg de pMDLg/pRRE, y 1,25µg de pRSVRev, necesarios para la formación de las partículas lentivirales. El sobrenadante de las células HEK293T, conteniendo los virus, fue recogido a las 48 horas de la transfección, filtrado mediante un filtro de 0,45 µm y se le añadió polibreno a una concentración final de 8 µg/ml. Después, dicho sobrenadante fue añadido a las células a infectar. Este proceso se repitió a las 12 horas con una concentración final de polibreno de 4 µg/ml y a las 24 horas con una concentración final de polibreno de 8 µg/ml. Tras 14 horas desde la última infección, la mitad de las placas de cada uno de los grupos fueron tratadas con LPS (10 µg/ml) durante 24 horas, tras las cuales todas las placas fueron procesadas para la extracción de proteína.

Vectores lentivirales	Expresión	Origen
pMD2-G	env	(Dull et al., 1998)
pMDLg/pRRE	gag-pol	(Dull et al., 1998)
pRSV-Rev	Rev	(Dull et al., 1998)

**Tabla IV.** Vectores lentivirales de tercera generación utilizados para la infección.

## **8. Estudios *in vitro***

### **8.1. Cultivos celulares**

#### **8.1.1. Cultivos de células GL261**

La línea celular de glioblastoma de ratón GL261, se obtuvo del banco de tumores *NCI-Frederick Cancer Research Tumor Repository* (Frederick, MD). La línea se propagó en medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco), 2 mM de glutamina, 2,5 µg/ml de fungizona y 40 µg/ml de gentamicina. Todas las células fueron mantenidas a 37° C de temperatura, 95 % de humedad y 5 % de presión de CO<sub>2</sub>. Las células GL261 fueron sembradas en placas de 24 pocillos para posteriores experimentos.

#### **8.1.2. Cultivos primarios de células gliales**

Este tipo de cultivo se realizó a partir de la corteza cerebral de ratas Wistar o ratones C57 de dos días de edad postnatal (P2). Una vez decapitados los animales se procedió a extraer el cerebro, eliminar las meninges y diseccionar la corteza cerebral, la cual se disgregó con una pipeta Pasteur de vidrio en medio de cultivo DMEM frío. El homogeneizado obtenido se centrifugó durante 10 minutos a 1050 rpm y tras eliminar el sobrenadante se resuspendió el pellet en DMEM 10:10:1 (DMEM con 10% de suero fetal bovino, 10% de suero de caballo y 1% de penicilina/estreptomicina) y se sembraron las células en frascos de cultivo previamente tratados con poli-D-lisina (20 µg/ml en agua). Tras 7 días de cultivo en condiciones estándar (95% de humedad, 37°C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub>), los frascos fueron agitados en un agitador orbital durante 4 horas a 230 rpm a 37°C, permitiendo así separar las células microgliales no adherentes del resto de tipos celulares, astrocitos y oligodendrocitos. A continuación los botes de cultivo fueron agitados durante toda la noche a 260 rpm a 37°C para separar oligodendrocitos de astrocitos. De esta manera se consiguió aislar la astrogía. Las células microgliales fueron sembradas en placas de 24 pocillos sobre cristales, y las células astrogiales fueron sembradas en placas de 60mm, en placas de 96 pocillos y en placas de 24 pocillos sobre cristales. Tras dos días en cultivo, la microglía y los astrocitos fueron tratados 24 horas con lipopolisacárido (LPS) a una concentración de 10 µg/ml, tal y como se describe en (Luna-Medina et al., 2007).

## 8.2. Extracción de proteína total de cultivos celulares y Western blot

Los cultivos de células GL261 y células gliales tratadas previamente con LPS durante 24 horas, fueron finalmente lavados 2 veces con PBS para proceder a la extracción de proteína total. Para extraer la proteínas, las células se lisaron en tampón de lisis (NaF 50 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM, EDTA 5mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Tritón X-100 0.5%, NaPPi 10 mM) y en presencia de inhibidores de fosfatasa y proteasas (ortovanadato sódico 0.2 mM y PMSF 0.4 mM). La concentración de proteína total se determinó por el método Bradford utilizando como patrón seroalbúmina bovina (BSA, Sigma).

Se separaron las proteínas (30µg por muestra) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% o al 12% bajo condiciones desnaturalizantes (SDS) y reductoras (PAGE-SDS) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Protan, Whatman, Dassel, Germany). Las membranas se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente en T-TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%) con un 5% de leche en polvo desnatada. A continuación se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario (**Tabla V**) en el medio de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Tras lavarse las membranas con T-TBS durante 15 minutos se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, conejo o cabra acoplado a peroxidasa (Sta. Cruz Biotech) durante 1 hora a temperatura ambiente en el medio de bloqueo. Los inmunocomplejos se visualizaron utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma) como control de carga.

En todos los casos, la imagen mostrada corresponde a un experimento representativo de, al menos, tres realizados.

Anticuerpo	Dilución	Origen	Procedencia
Anti-C3	1/200	Conejo	Abcam
Anti-C/EBP $\beta$	1/250	Ratón	Abcam.
Anti-Cox2	1/100	Cabra	Santa Cruz Biotech.
Anti-IL-1 $\beta$	1/1000	Conejo	Abcam
Anti- $\alpha$ -tubulina	1/5000	Ratón	Sigma

**Tabla V.** Anticuerpos primarios utilizados

### 8.3. Inmunocitoquímica

Las células de astrocitos y microglía de rata y ratón fueron crecidas durante 24 horas en cristales, dentro de placas de 24 pocillos. A continuación, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% en PBS durante 30 minutos. Después de ser lavadas con PBS 1x, fueron bloqueadas e incubadas con el correspondiente anticuerpo primario a 37°C durante 1 hora. Tras 3 lavados de PBS 1x se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario fluorescente durante 45 minutos a 37°C, tras lo cual fueron teñidas con DAPI (Cambiochem, 1/1000) y finalmente lavadas con PBS 1x. Una vez montados los cristales sobre portas con Vectashield, las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal Radiance 2100 (Bio-Rad).

Los anticuerpos utilizados en inmunocitoquímica se resumen en la **Tabla VI**.

Anticuerpo primario	Dilución	Origen	Procedencia
Anti-C3	1/50	Conejo	Abcam
Anti-C/EBPβ	1/100	Ratón	Abcam.
Anticuerpo secundario	Dilución	Origen	Procedencia
Alexa-488	1/400	Conejo	Molec.Probes
Alexa-647	1/400	Ratón	Molec.Probes

**Tabla VI.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunocitoquímica

### 8.4. Determinación de nitritos.

Los niveles de nitritos en el medio de cultivo, como medida de la producción de óxido nítrico, se evaluaron en el sobrenadante de células astrogiales en placas de 96 pocillos. Estos cultivos fueron tratados 24 y 48 horas con el agente citotóxico LPS (10 µg/ml), tras lo cual se realizó la medición de los niveles de nitritos producidos. Para ello se mezcló la misma cantidad de sobrenadante que de reactivo de Griess (40 mg/ml agua) y tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 540 nm con un lector de placas. La concentración de nitritos se determinó a partir de una curva patrón con concentraciones conocidas de nitrito de sodio.

## **9. Estudios *in vivo***

### **9.1. Animales**

Se han utilizado ratas Wistar macho y ratones C57 macho de entre 8 y 12 semanas de edad procedentes del animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid, donde fueron criados en condiciones óptimas de temperatura y humedad, en ciclos de 12 horas de luz-oscuridad y con agua y comida *ad libitum*. Los protocolos experimentales usados y el trato a los animales fue previamente aprobado por la Comisión de Bioéticas para la Investigación Animal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, según lo recogido por las normativa española (RD. 1201/2005, del 10 de Octubre) y europea (normativa 86/609). Los procedimientos utilizados fueron diseñados con el fin de reducir al máximo el número de animales a utilizar, adaptándose en todo momento las medidas pertinentes para minimizar el sufrimiento de los mismos.

### **9.2. Modelo de daño excitotóxico**

Se utilizó como modelo de daño excitotóxico y de neurodegeneración la administración de ácido kaínico (AK; Sigma). La administración de esta excitotoxina provoca la aparición de convulsiones en los animales y daño neurológico en diversas áreas del cerebro, particularmente en el hipocampo (Holopainen, 2008; Raviza et al., 2008). Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina (60mg/Kg) y medetomidina (0,125 mg/Kg) y colocados en una aparato estereotáxico (Kopf Instruments, CA). En ratones el AK (0,25 µg en 2,5 µl de suero salino) fue administrado en el hipocampo izquierdo a una velocidad de 1 µl /minuto usando las siguientes coordenadas desde Bregma: posterior -2,0 mm, lateral -1,25 mm y a una profundidad de 1,75 mm; y en rata las coordenadas fueron posterior -3,0 mm, lateral -2,0 mm, profundidad 3,5 mm, acorde con el atlas de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). Animales control de la misma edad fueron inyectados con suero salino.

### **9.3. Extracción de proteína de tejidos y Western blot**

La extracción de tejidos para Western blot se llevó a cabo mediante procedimiento estándar. Tras el sacrificio de los animales se extrajo y diseccionó el cerebro, almacenándose las diferentes áreas de interés a -80°C hasta su posterior uso. Para la extracción de proteínas, las muestras fueron homogeneizadas, con ayuda de un homogeneizador de émbolo de vidrio a 4°C en tampón RIPA (1% NP 40 Igepal, 0,5%

deoxicolato sódico y 0.1% docecil sulfato sódico (SDS) en PBS), conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas (1mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 1mM de ortovanadato de sodio y 10mM de pirofosfato sódico). La concentración de proteína total se determinó por el método Bradford (Bio-Rad Hércules, CA) utilizando como patrón seroalbúmina bovina (BSA, Sigma).

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 6 o 12 % bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras de SDS (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios tal como se indica en el apartado 8.2. Se utilizó el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina como control de carga. Los anticuerpos utilizados en este trabajo se describen en la **Tabla VII**.

En todos los casos, la imagen mostrada corresponde a un experimento representativo de, al menos, tres realizados.

Anticuerpo	Dilución	Origen	Procedencia
Anti-C3	1/250	Ratón	Santa Cruz Biotech.
Anti-C/EBP $\beta$	1/250	Conejo	Santa Cruz Biotech.
Anti- $\alpha$ -tubulina	1/5000	Ratón	Sigma

**Tabla VII.** Anticuerpos primarios utilizados

## 9.4. Estudios histoquímicos

### 9.4.1. Obtención de muestras

Los animales previamente anestesiados se perfundieron transcardíacamente con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS. Los cerebros se postfijaron a 4°C durante 24h en la misma solución y crioprotegieron en dicha solución con sacarosa al 30%. Finalmente se congelaron en hielo seco y mantuvieron a -80°C. Se realizaron cortes coronales de los cerebros en un criostato Cryocut 1900 (Leica), en secciones de 30  $\mu$ m que se conservaron en tampón de congelación (30% glicerol, 30% etilenglicol y 40% de tampón fosfato (PB) 0.1M) y almacenaron a -80°C hasta su uso.

### 9.4.2. Tinción histológica TUNEL (Terminal dUTP Nick End Labeling)

Se utilizó para detectar apoptosis celular. Las secciones coronales de hipocampo se montaron en portas con gelatina, y la tinción se llevó a cabo según procedimiento del kit

“In Situ Cell Death Detection Kit, POD”, de Roche. Los cortes fueron fotografiados en un microscopio Nikon 90i acoplado a una cámara Nikon DS-Fi.

#### **9.4.3. Tinción histológica con hematoxilina**

Esta tinción se utilizó como contratinción para un análisis histológico más preciso. Para ello las secciones coronales de hipocampo previamente inmunoteñidas con el anticuerpo contra la proteína C3, fueron montadas en portas gelatinizados y sumergidos en una solución con hematoxilina (1mg/ml en agua) durante 2 minutos. A continuación se deshidrataron en alcoholes de concentraciones ascendentes y tras un paso final por xilol fueron cubiertas con DePeX para posteriormente ser analizadas.

#### **9.4.4. Tinción con Fluoro-Jade B.**

Esta tinción se utilizó para marcar neuronas dañadas, en proceso de degeneración (Schmued et al., 1997). Secciones montadas en portas gelatinizados se sumergieron en baños sucesivos con alcohol 100%, alcohol 70% y agua destilada para después preincubar durante 15 minutos en agitación con una disolución acuosa con 0,06% de permanganato. Tras incubar con la solución de tinción (0,001% de Fluoro-Jade B (Chemicon) en ácido acético) durante 30 minutos a temperatura ambiente, las secciones fueron lavadas con agua destilada, secadas a temperatura ambiente y montadas con DePeX. Las muestras fueron fotografiadas en un microscopio Nikon 90i acoplado a una cámara Nikon DS-Qi1Mc.

#### **9.4.5. Inmunohistoquímica**

Se utilizaron secciones en flotación que se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario y en las condiciones específicas, en función de si iban a ser visualizadas con diaminobencidina (DAB) o con fluorescencia. La especificidad de anticuerpos utilizados se verificó mediante la ausencia de señal al omitir el anticuerpo primario.

##### **9.4.5.1. Revelado con diaminobencidina**

El primer paso fue la inhibición de la actividad peroxidasa endógena mediante la incubación con 1,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS durante 30 minutos. A continuación las muestras se bloquearon con 5% de suero normal (de cabra o caballo, según corresponda), con 0,1M de lisina y 0,1% de Tritón X-100. Los cortes se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios correspondientes diluídos en la misma solución de bloqueo y después se lavaron



3 veces con PBS, Los anticuerpos primarios fueron visualizados usando anticuerpos secundarios biotinilados, con los que se incubaron las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de un tratamiento con el kit Vectastain elite ABC complex (Vector). Todas las secciones se montaron sobre portas gelatinizados para posteriormente ser fotografiados con un microscopio Nikon 90i acoplado a una cámara Nikon DS-Fi. La **Tabla VIII** muestra los anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Dilución	Origen	Procedencia
Anti-C3	1/50	Conejo	Abcam
Anti- C/EBP $\beta$	1/100	Ratón	Abcam

**Tabla VIII.** Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica

#### 9.4.5.2. Fluorescencia

La incubación con los anticuerpos primarios (**Tabla IX**) se llevó a cabo de manera similar a lo expuesto en el apartado 9.4.5.1., excepto por la omisión de la inactivación de las peroxidasas endógenas. La visualización se llevó a cabo mediante el uso de anticuerpos conjugados a Alexa-488 (fluoróforo verde) y Alexa-647 (fluoróforo rojo), todos ellos obtenidos de Molecular Probes (OR, USA). Todas las secciones se montaron sobre portas y posteriormente se fotografiaron con un microscopio confocal Radiante 2100 o Nikon 90i acoplado a una cámara Nikon DS-Qi1Mc o Nikon DS-Fi.

Anticuerpo primario	Dilución	Origen	Procedencia
Anti-C3	1/50	Conejo	Abcam
Anti-GFAP	1/150	Conejo	DaKo
Anti- C/EBP $\beta$	1/100	Ratón	Abcam
Neurotrace	1/200	Ratón	Molec. Probes
Texas Red Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectin	1/200	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Vector Labs
Anticuerpo secundario	Dilución	Origen	Procedencia
Alexa-488	1/400	Conejo	Molec.Probes
Alexa-647	1/400	Conejo	Molec.Probes

**Tabla IX.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunohistoquímica de fluorescencia

#### 9.4.5.3. M.O.M Immunodetection kit (Mouse on Mouse)

Este kit de “Vector Labs” se ha empleado para realizar inmunohistoquímicas en tejido de ratón donde el origen de los anticuerpos primarios utilizados era de ratón (**Tabla X**).

El análisis inmunohistoquímico para diaminobencidina se realizó tal como se describe en el protocolo de “*Vector M.O.M. Immunodetection Basic*”, y el análisis para fluorescencia, como se describe en el protocolo de “*Vector M.O.M. Fluorescein Kit*”.

Anticuerpo primario	Dilución	Origen	Procedencia
Anti-C/EBP $\beta$	1/100	Ratón	Abcam

**Tabla X.** Anticuerpo primario utilizado en la técnica M.O.M Immunodetection kit

## 10. Estadística

Los resultados de los estudios *in vitro* se analizaron estadísticamente. Dado el tamaño de la muestra, en los experimentos *in vitro* se utilizó la distribución *t de Student* de dos colas. Los niveles de significancia estadística se establecieron con los siguientes valores de *p*: \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .



## Resultados



## 1. Análisis de microarrays del efecto de C/EBPβ en el transcriptoma de hipocampo de ratón

Como hemos comentado en la Introducción, apartado 2.4., C/EBPβ tiene un papel importante en hipocampo regulando procesos inflamatorios y excitotóxicos, por tanto realizamos estudios de microarrays para analizar qué genes podrían estar mediando la acción de C/EBPβ en esta zona del cerebro. Para ello utilizamos mRNA aislado de hipocampo de ratones silvestres (C/EBPβ<sup>+/+</sup>, Wt) y deficientes en C/EBPβ (C/EBPβ<sup>-/-</sup>, KO).

Los resultados de los microarrays mostraron 33 genes diferencialmente expresados entre ratones Wt y KO, de los cuales 17 estaban inducidos por C/EBPβ (**Tabla 1**) y 16 inhibidos por C/EBPβ (**Tabla 2**). Estos genes están implicados en diferentes procesos celulares como metabolismo, hematopoyesis, adipogénesis, transducción, respuesta inmune y morfogénesis. Dieciocho de estos genes están relacionados con inflamación y daño celular. Realizamos RT-PCR de uno de estos últimos genes (**Tabla 3**) para confirmar su expresión diferencial entre ratones Wt y KO. Observamos un descenso muy importante de C3, cuyos niveles en animales C/EBPβ<sup>-/-</sup> disminuyeron un 80% en comparación con los animales silvestres (**Figura 1**), sugiriendo que C3 podría tener un papel importante en los efectos pro-inflamatorios y excitotóxicos de C/EBPβ en esta zona del cerebro. Dada la importancia de C3 en este tipo de procesos y su significativa regulación por C/EBPβ, en este estudio decidimos centrarnos en el papel que C3 pudiera tener en los efectos observados de C/EBPβ.

GENES INDUCIDOS POR C/EBPβ				
ID	GENEBANK	UNIGEN	SÍMBOLO	NOMBRE
12266	NM_009778.2	Mm.19131	C3	Complement component 3
17110	NM_013590.4	Mm.177539	LYZ1	Lysozyme 1
50934	NM_016972.2	Mm.276831	SLC7A8	Solute carrier family member 8
11689	NM_009662.2	Mm.41072	ALOX5	Arachidonate 5-lipoxygenase
170442	NM_053262.3	Mm.27335	BBOX1	Butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase (gamma-butyrobetaine hydroxylase)
71856	NM_027961.1	Mm.330770	WFDC3	WAP four-disulfide core domain 3

67712	NM_026331.3	Mm.293635	SLC25A37	Solute carrier family 25, member 37
114664	NM_053262.3	Mm.46019	Hsd17b11	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 11

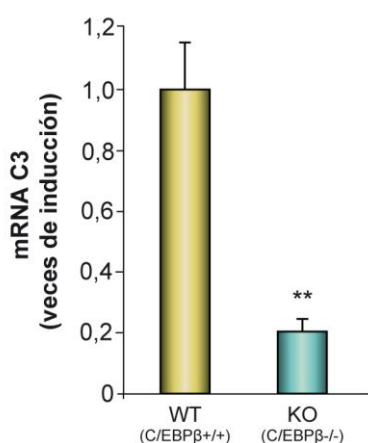
**Tabla 1.: Algunos de los genes inducidos por C/EBP $\beta$  en hipocampo de ratón.**

GENES INHIBIDOS POR C/EBP $\beta$				
ID	GENEBANK	UNIGEN	SÍMBOLO	NOMBRE
11538	NM_009628.2	Mm.201322	DNAP	Activity-depent neuroprotective protein
17306	NM_008596.1	Mm.316885	SYPL2	Synaptophysin-like 2
16323	NM_008380.1	Mm.8042	INHBA	Inhibin beta-A
18619	NM_001002927.2	Mm.475097	PENK1	Preproenkephalin 1
209837	NM_172479.2	Mm.6055	SLC38A5	Solute carrier family 38, member 5
17312	NM_001204252.1	Mm.252405	MGL1	Macrophage galactose N-acetyl galactosamine especific lectic 1
70673	NM_001177995.1	Mm.257785	PRDM16	PR domain containing 16
69136	NM_026954.1	Mm.171558	TUSC1	Tumor suppressor candidate 1
26423	NM_139051.3	Mm.31387	NR5A1	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1
109624	NM_145575.3	Mm.308134	CALD1	Caldesmon 1

**Tabla 2: Algunos de los genes inhibidos por C/EBP $\beta$  en hipocampo de ratón.**

GEN CONFIRMADO POR RT-PCR				
ID	GENEBANK	UNIGEN	SÍMBOLO	NOMBRE
12266	NM_009778.2	Mm.19131	C3	Complement component 3

**Tabla 3.: Gen confirmado por RT-PCR como diferencialmente expresado entre ratones C/EBP $\beta$ <sup>+/+</sup> y C/EBP $\beta$ <sup>-/-</sup>.**



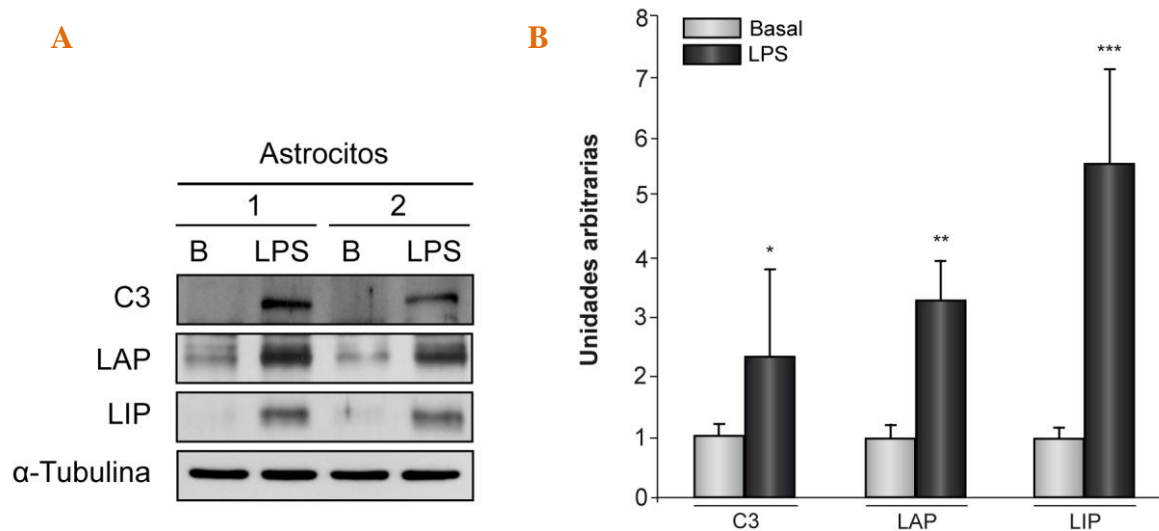
**Figura 1. Niveles de mRNA de C3 en hipocampo de ratones *C/EBPβ*<sup>+/+</sup> y *C/EBPβ*<sup>-/-</sup>.** Se extrajo el RNA total del hipocampo y se determinó el contenido de mRNA C3 por RT-PCR tal como se indica en Materiales y Métodos. \*\*p≤0,01.

## 2. Regulación por LPS de la expresión de *C/EBPβ* y C3 *in vitro*.

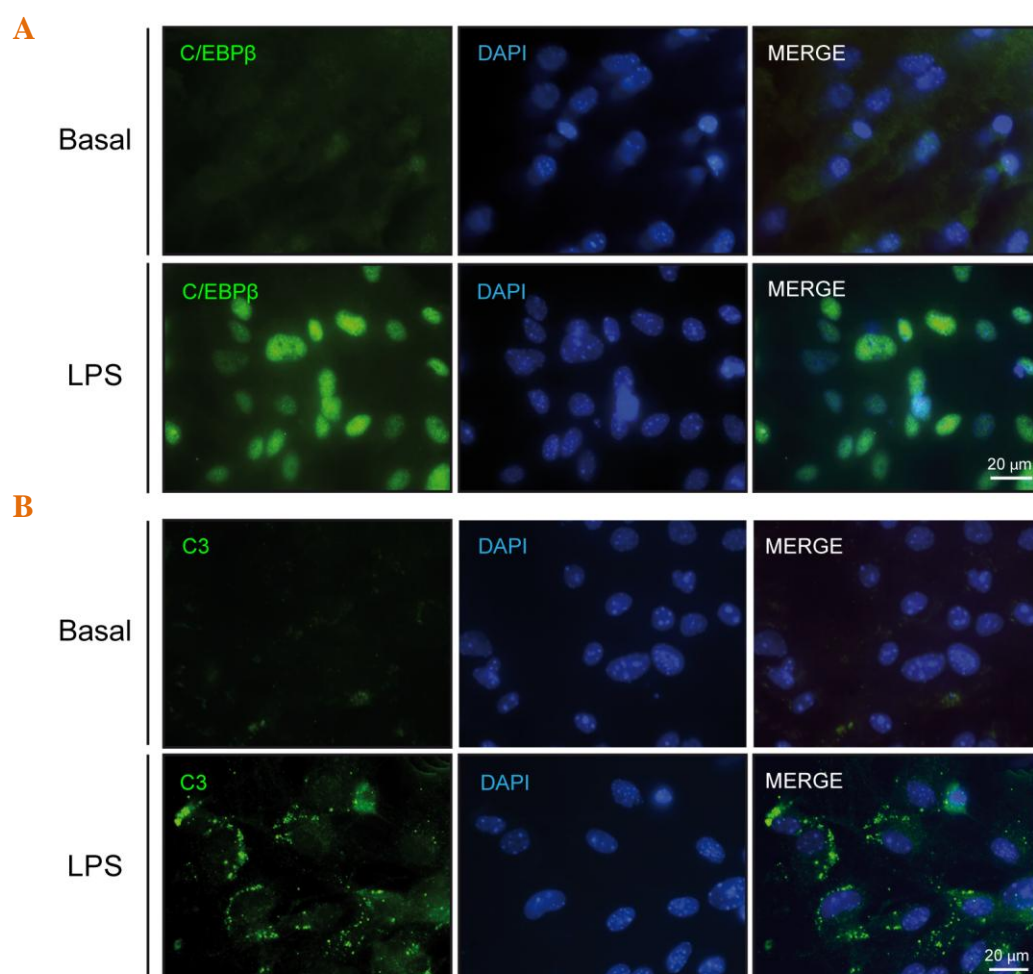
Con el fin de estudiar la relación entre *C/EBPβ* y la expresión hipocampal de C3 sugerida por el análisis de microarrays, estudiamos inicialmente la respuesta de ambos genes a la administración de LPS en distintos tipos celulares.

### 2.1. Cultivos primarios de astrocitos de rata

Determinamos inicialmente el contenido de proteína *C/EBPβ* y C3 por western blot en cultivos de astrocitos primarios de rata. Observamos un aumento en los niveles de proteína de *C/EBPβ* y C3 tras el tratamiento con LPS (**Figura 2**). Posteriormente, mediante estudios de inmunocitoquímica confirmamos la inducción de *C/EBPβ* y C3 por LPS, observándose una colocalización de ambas proteínas en las mismas células (**Figura 3**). *C/EBPβ* tiene una localización nuclear (**Figura 3A**) y su expresión es fuertemente inducida por LPS, lo que está de acuerdo con resultados previos de nuestro laboratorio (Cortes-Canteli et al., 2008). Los cultivos de astrocitos no tratados, presentan una leve tinción citoplasmática por marcaje de C3, y cuando estos cultivos se tratan con LPS se observa una fuerte tinción de C3 característica en punteado en el citoplasma (**Figura 3B**). A continuación analizamos si *C/EBPβ* y C3 colocalizaban en dichos cultivos. Los análisis de inmunocitoquímica, mostraron que los cultivos primarios de astrocitos de rata tratados con LPS presentan una fuerte tinción nuclear de *C/EBPβ* y citoplasmática de C3, colocalizando ambas proteínas en las mismas células (**Figura 3C**).

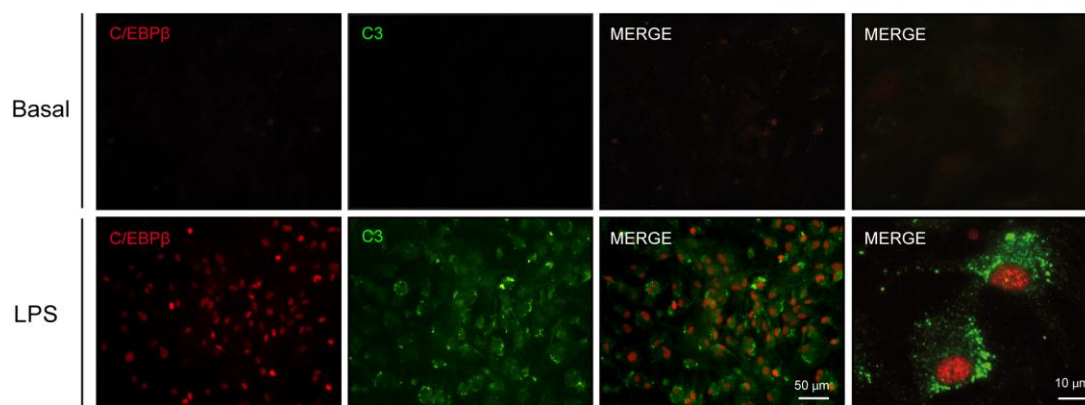


**Figura 2. Inducción por LPS de la expresión de C/EBP $\beta$  y C3 en cultivos primarios de astrocitos de rata.** Los cultivos se trataron con LPS (10 $\mu$ g/ml) o con vehículo. A las 24 h se extrajeron las proteínas y se procesaron tal como se indica en Materiales y Métodos. **(A)** Western blot representativo de C3 y C/EBP $\beta$  (isoformas LAP y LIP). **(B)** Cuantificación de al menos tres Western blots. \* $p \leq 0,05$  vs cultivos basales; \*\* $p \leq 0,01$  vs cultivos basales; \*\*\* $p \leq 0,001$  vs cultivos basales.





C

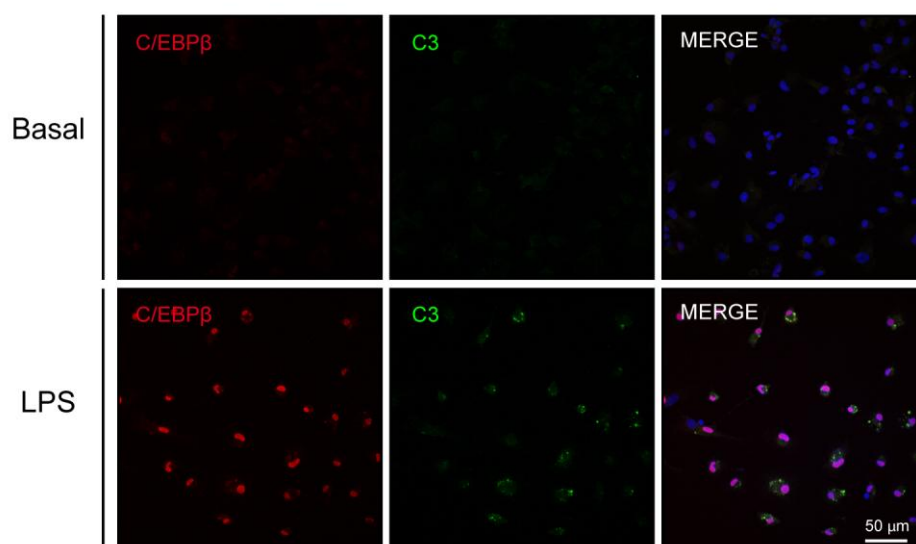


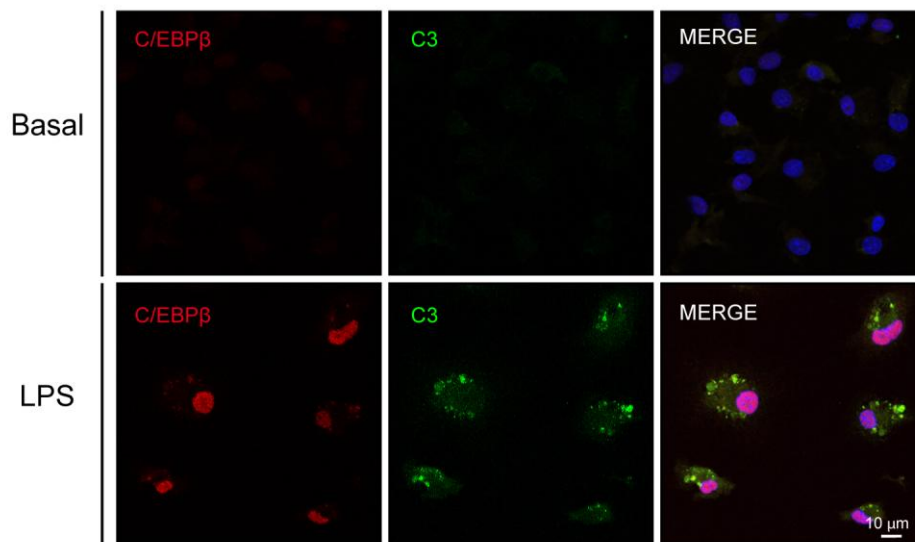
**Figura 3. Análisis de inmunofluorescencia de la inducción por LPS de la expresión de C/EBPβ y C3 en cultivos primarios de astrocitos de rata.** Los cultivos fueron tratados con LPS (10μg/ml) o con vehículo y procesados a las 24 h tal como se indica en Materiales y Métodos. **(A)** Inducción de C/EBPβ (verde) por LPS. **(B)** Inducción de C3 (verde) por LPS. **(C)** Inducción de C/EBPβ (rojo) y C3 (verde) por LPS. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Imágenes representativas de microscopía confocal. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal (Zeiss) utilizando los mismos parámetros.

## 2.2. Cultivos primarios de microglía de rata

Analizamos también, en cultivos primarios de microglía de rata, el efecto de LPS sobre la expresión de C/EBPβ y C3. Nuestros resultados muestran que al igual que lo observado en astrocitos se produce un aumento en la expresión de C/EBPβ y C3 tras activar estas células con LPS. En ausencia de estímulo prácticamente no se detectan ninguna de las dos proteínas. Sin embargo, tras el tratamiento con LPS, hay una fuerte inducción de los niveles de proteína de C/EBPβ, que se ve acompañada de una inducción de los niveles de C3, coexpresando en las mismas células (**Figura 4**), al igual que ocurría con los cultivos de astrocitos.

A

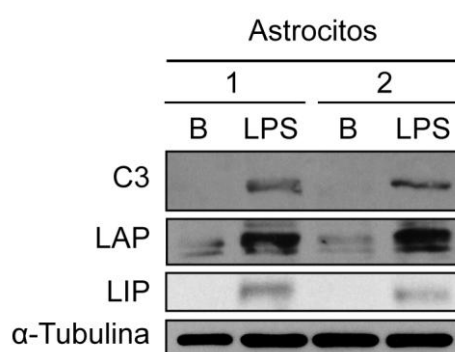
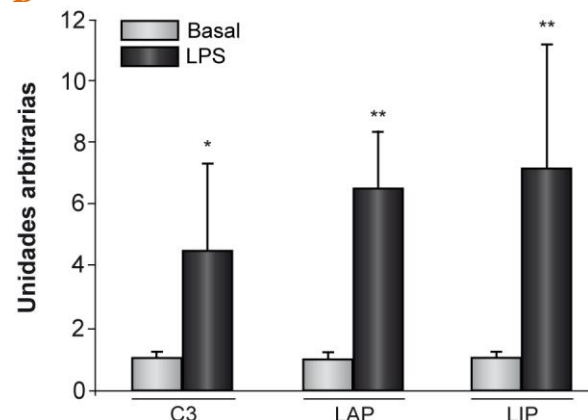


**B**

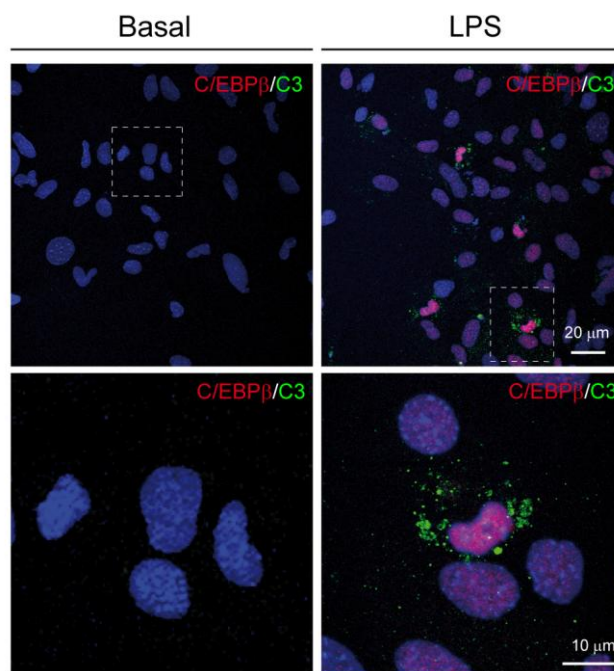
**Figura 4. Inducción por LPS de la expresión de C/EBPβ y C3 en cultivos primarios de microglía de rata.** Los cultivos fueron tratados con LPS (10μg/ml) o con el vehículo y procesados a las 24 h para análisis por inmunofluorescencia tal como se indica en Materiales y Métodos. **(A)** Expresión de C/EBPβ (rojo) y C3 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). **(B)** Imágenes ampliadas. Imágenes representativas de microscopía confocal. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal (Zeiss) utilizando los mismos parámetros.

### 2.3. Cultivos primarios de astrocitos de ratón

Los resultados obtenidos en los microarrays corresponden a ratón, por lo cual a continuación analizamos si en células de ratón la expresión de los genes C/EBPβ y C3 era también regulada por LPS como hemos visto en células de rata. Por análisis de Western blot observamos que cultivos primarios de astrocitos aislados de ratón muestran un aumento en los niveles de proteína de C/EBPβ acompañado por un aumento en los niveles de proteína de C3 tras el tratamiento con LPS (**Figura 5A**). De nuevo observamos una colocalización de C/EBPβ y C3 en las mismas células (**Figura 5C**).

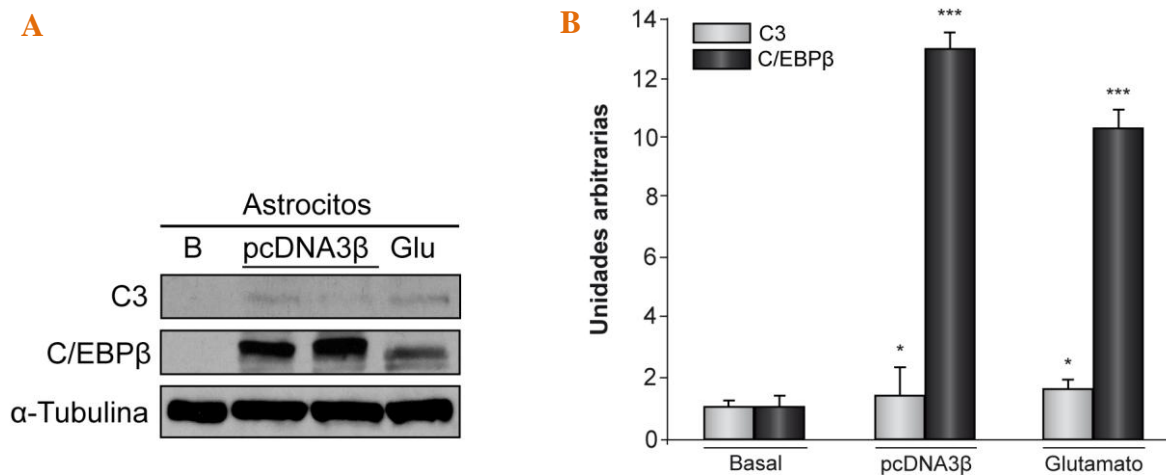
**A****B**

C



**Figura 5. Inducción por LPS de la expresión de C/EBPβ y C3 en cultivos primarios de astrocitos de ratón.** Los cultivos fueron tratados con LPS (10μg/ml) o con el vehículo y procesados a las 24 h tal como se indica en Materiales y Métodos. **(A)** Análisis de Western blot de C3 y C/EBPβ (isoformas LAP y LIP). Se muestran imágenes representativas y cuantificación **(B)** de al menos tres Western blots. \* $p \leq 0,05$  vs cultivos basales; \*\* $p \leq 0,01$  vs cultivos basales. **(C)** Análisis de inmunofluorescencia de la expresión de C/EBPβ (rojo) y C3 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Imágenes representativas de microscopía confocal. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal (Zeiss) utilizando los mismos parámetros.

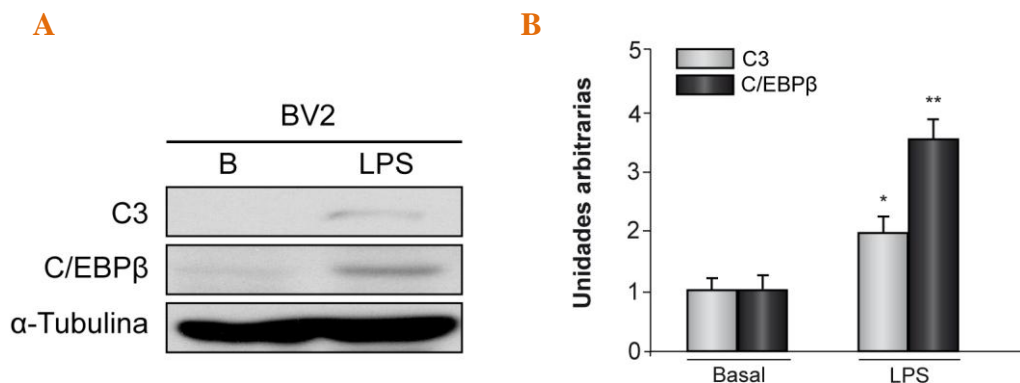
Los resultados obtenidos sugieren que C/EBPβ podría estar regulando la expresión de C3 ya que vemos: 1) un paralelismo completo en la respuesta de ambas proteínas a LPS tanto en células gliales de rata como de ratón, y 2) una disminución de la expresión de C3 en el hipocampo de ratones carentes de C/EBPβ. Por todo ello analizamos si la sobreexpresión forzada de C/EBPβ por transfección transitoria del vector pcDNA3-C/EBPβ (pcDNA3β) era capaz de inducir la expresión endógena de C3. Como puede verse en la **Figura 6**, un aumento de la expresión de C/EBPβ lleva consigo un aumento de C3. Comprobamos también que en cultivos de astrocitos tratados con glutamato (Glu), un inductor de la expresión de C/EBPβ (Cortes-Canteli et al., 2008), se produce un aumento de C/EBPβ y de C3 (**Figura 6**).



**Figura 6. Inducción de C3 por la sobreexpresión forzada de C/EBPβ, e inducción de C/EBPβ y C3 por glutamato en cultivos primarios de astrocitos de ratón.** Cultivos celulares se transfectaron de forma transitoria con el vector de sobreexpresión de C/EBPβ (pcDNA3β) o se trataron con glutamato durante 24 h y se procesaron para análisis de Western blot tal como se indica en Materiales y Métodos. **(A)** Análisis de western blot de C3 y C/EBPβ (isoformas LAP y LIP). Se muestran imágenes representativas y cuantificación. **(B)** de al menos tres Western blots. \* $p \leq 0,05$  vs cultivos basales; \*\*\* $p \leq 0,001$  vs cultivos basales.

#### 2.4. Línea BV2 de ratón

Posteriormente estudiamos si los resultados mostrados anteriormente con cultivos primarios se obtenían también con una línea establecida de células gliales. Para ello utilizamos la línea celular de microglía de ratón, BV2. Los análisis de Western blot mostraron de nuevo que tras el tratamiento con LPS, se produce un aumento en la expresión de ambas proteínas, C/EBPβ y C3 (**Figura 7**). Estos resultados confirman los obtenidos con cultivos primarios de células gliales.



### **Figura 7. Inducción por LPS de la expresión de C3 y C/EBP $\beta$ en células de microglía de ratón BV2.**

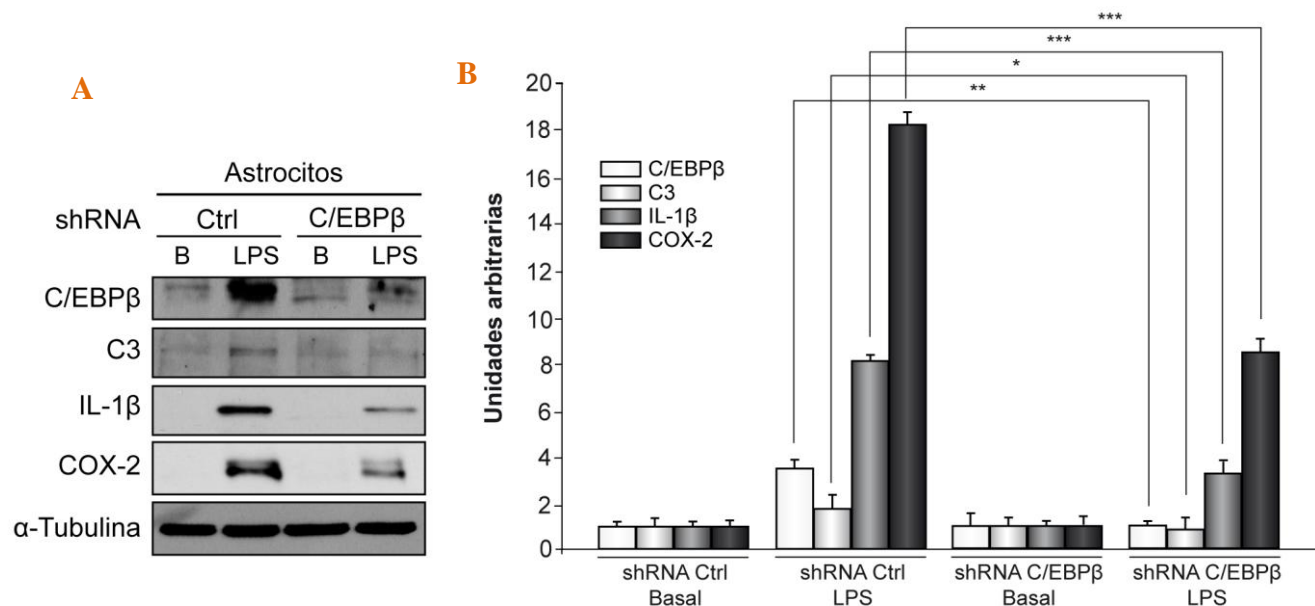
Las células se estimularon con LPS (10 $\mu$ g/ml) o vehículo y 24 h después se procesaron para análisis de Western blot tal como se indica en Materiales y Métodos. (A) Se muestran imágenes representativas y cuantificación (B) de al menos tres Western blots. \* $p \leq 0,05$  vs cultivos basales; \*\* $p \leq 0,01$  vs cultivos basales.

### **2.5.-Efecto de C/EBP $\beta$ y C3 sobre la expresión de IL-1 $\beta$ y COX-2 y la producción de nitritos en astrocitos de ratón.**

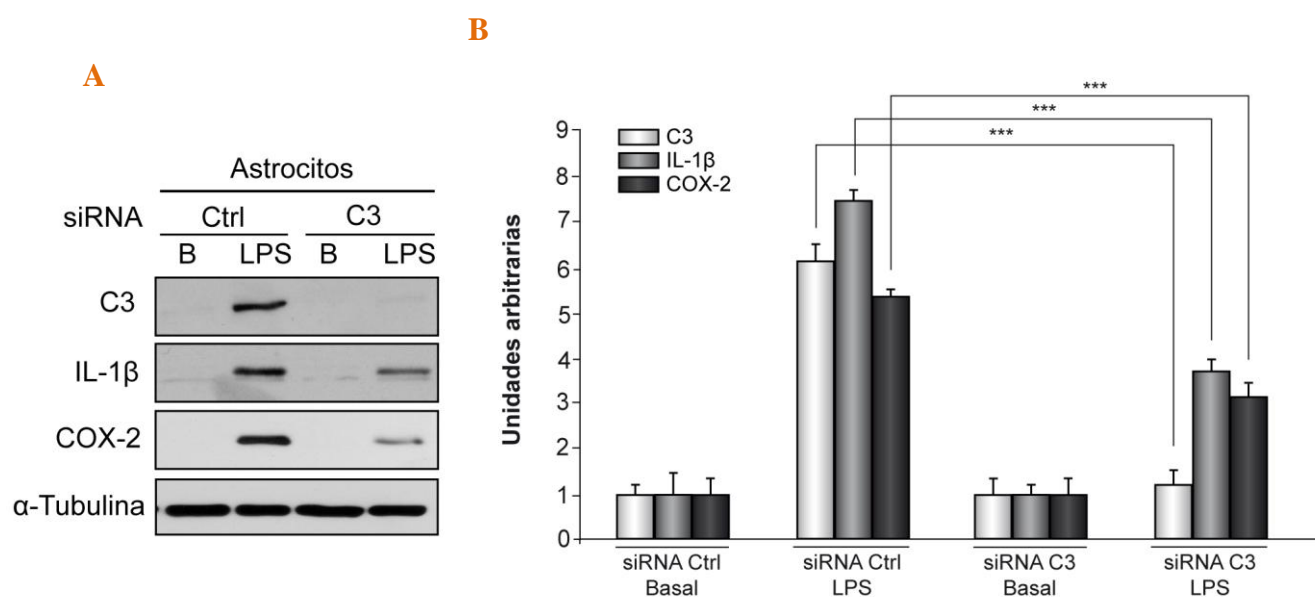
Estudios previos de nuestro laboratorio (Cortes-Canteli et al., 2008) mostraron que la producción de proteínas proinflamatorias inducida por LPS esta claramente disminuía en cultivos de astrocitos de ratones KO para C/EBP $\beta$  (Cortes-Canteli et al., 2008), lo que indica que este factor de transcripción está implicado en la regulación de la expresión de agentes inflamatorios en el cerebro. Con objeto de confirmar los efectos de C/EBP $\beta$  sobre proteínas pro-inflamatorias en cultivos primarios de astrocitos analizamos el efecto del bloqueo de la expresión de C/EBP $\beta$  mediante interferencia utilizando iRNA, sobre la producción de agentes proinflamatorios en astrocitos. Para ello, infectamos los astrocitos con lentivirus conteniendo un shRNA específico de C/EBP $\beta$  (ver Materiales y Métodos). Tras el tratamiento con LPS durante 72 h, aquellos astrocitos infectados con el interferente de C/EBP $\beta$  muestran una disminución de los niveles de proteína de C3, IL-1 $\beta$  y COX-2 en comparación con los controles (**Figura 8**) lo que claramente está de acuerdo con los resultados anteriores comentados que sugieren que C/EBP $\beta$  induce la expresión de los agentes pro-inflamatorios como IL-1 $\beta$  o COX-2.

En vista de los resultados anteriores, donde observamos que los niveles de proteína C3 aumentan en cultivos primarios de células gliales tras el tratamiento con LPS, quisimos analizar el efecto directo de C3 sobre la expresión de agentes proinflamatorios. Para analizar su papel en cultivos primarios de astrocitos, realizamos transfecciones transitorias con RNAs de interferencia (oligonucleótidos, siRNAs) específicos de C3 (ver Materiales y Métodos). Evaluamos la eficiencia de la transfección y sus efectos sobre agentes proinflamatorios tras un tratamiento con LPS. El Western blot que se presenta en la **Figura 9** muestra una drástica disminución en los niveles de expresión de C3 tras 72 horas de tratamiento con LPS en los cultivos interferidos en comparación con los cultivos controles. Esta disminución de C3 va acompañada de un descenso de los niveles de proteína de los agentes proinflamatorios IL-1 $\beta$  y COX-2. Paralelamente medimos la producción de nitritos en cultivos primarios de ratón interferidos en C3 y tratados 24 h con LPS, y

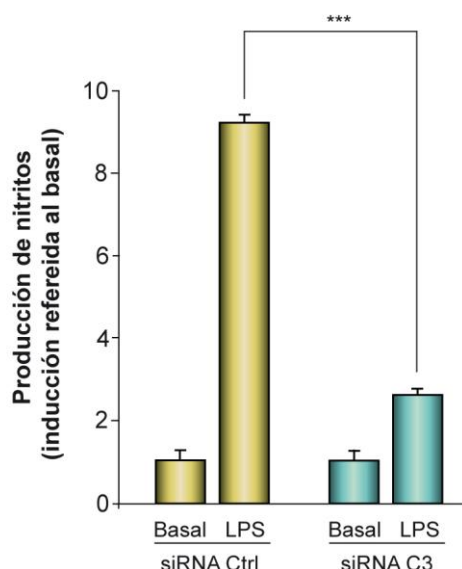
observamos que la interferencia de C3 también disminuye aproximadamente siete veces los niveles de nitritos en estos cultivos (**Figura 10**)



**Figura 8. Efecto del bloqueo de la expresión de C/EBPβ inducida por LPS sobre la expresión de IL-1β y COX-2.** Los cultivos fueron tratados con LPS (10μg/ml) o con el vehículo y procesados a las 72 h tal como se indica en Materiales y Métodos. Análisis de Western blot (**A**) de la expresión de C3, IL-1β y COX-2 en cultivos controles (shRNA Ctrl) e interferidos en C/EBPβ (shRNA C/EBPβ) con y sin tratar con LPS. Se muestran imágenes representativas y cuantificación (**B**) de al menos tres Western blots. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .



**Figura 9. Efecto del bloqueo de la inducción de C3 por LPS sobre la expresión de IL-1 $\beta$  y COX-2.** Los cultivos fueron tratados con LPS (10 $\mu$ g/ml) o con el vehículo y procesados a las 72 h tal como se indica en Materiales y Métodos. Análisis de Western blot (A) de la expresión de C3, IL-1 $\beta$  y COX-2 en cultivos controles (siRNA Ctrl) e interferidos en C3 (siRNA C3) con y sin tratar con LPS. Se muestran imágenes representativas y cuantificación (B) de al menos tres Western blots. \*\*\*p $\leq$ 0,001.



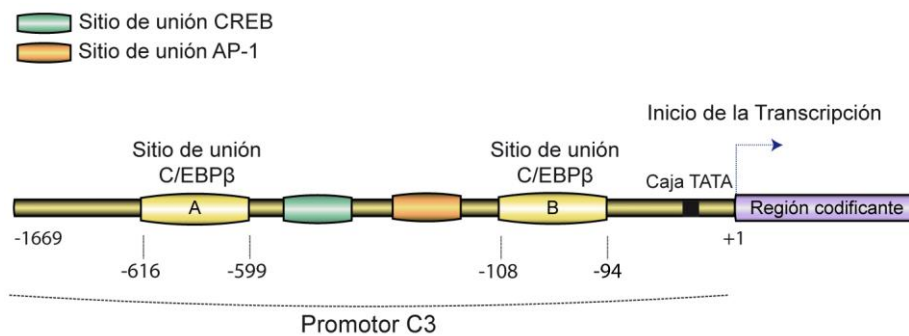
**Figura 10. Producción de nitritos de astrocitos primarios de ratón interferidos en C3.** Los cultivos primarios de astrocitos de ratón se transfectaron con RNA de interferencia control (siRNA Ctrl) o con RNA de interferencia para C3 (siRNAC3) y se trataron con LPS determinándose los niveles de nitritos a las 24 hr tal como se indica en Materiales y Métodos. \*\*\*p $\leq$ 0,001.

### 3. Análisis del promotor de C3: regulación por C/EBP $\beta$ .

Los resultados presentados hasta ahora sugieren que C/EBP $\beta$  regula la expresión de C3. Para analizar en más detalle si esta regulación se produce de una manera directa estudiamos la regulación del promotor de ratón de C3 por C/EBP $\beta$ .

Mediante análisis *in silico*, utilizando los programas Ensembl, para obtener la secuencia del promotor de C3 de ratón, y Mat Inspector para buscar posibles sitios de unión de C/EBP $\beta$  en dicho promotor, detectamos que en las posiciones -616/-599 y -108/-94 se encontraban dos sitios de unión consenso para C/EBP $\beta$  (Figura 11). Al sitio más 5' lo denominamos A, y al más 3' lo denominamos B. Además de estos dos sitios, encontramos sitios de unión para otros factores de transcripción como CREB y AP-1, a los cuales se ha descrito que C/EBP $\beta$  podría unirse también como homodímero o formando heterodímeros con estas proteínas (Flammer et al., 2006, Hsu et al., 1994), y de esta forma modificando su capacidad de transactivación.





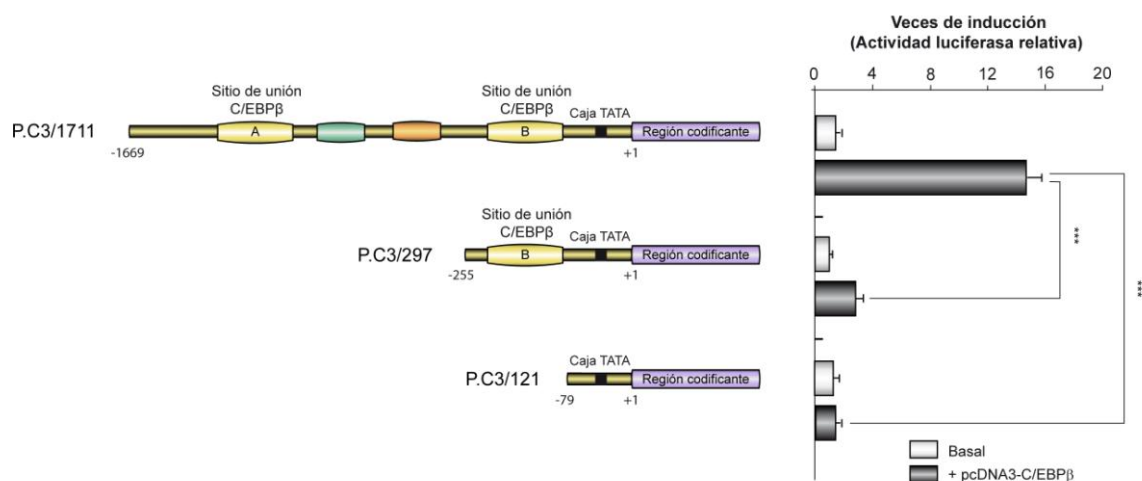
**Figura 11. Esquema del Promotor de C3 de ratón.** El promotor contiene dos sitios de unión para C/EBP $\beta$  en las posiciones (-616/-599) y (-108/-94).

Para realizar los estudios de regulación del promotor de C3, amplificamos por PCR un fragmento de 1711 pares de bases del promotor de ratón que se extendía desde la posición -1669 a +42 de dicho promotor a partir de DNA genómico de ratón. Dicho fragmento, lo clonamos en el plásmido pGL4.10 dando lugar a la construcción P.C3/1711 y realizamos análisis de transfección transitoria de dicha construcción en células GL261 junto con el plásmido de sobreexpresión de C/EBP $\beta$  (pcDNA3- C/EBP $\beta$ ). Analizamos la actividad del promotor 24 horas después de la cotransfección con ambas construcciones, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos (**Figura 12**) muestran que la cotransfección con un plásmido que sobreexpresa C/EBP $\beta$  induce 14 veces la actividad del promotor de C3, con respecto a los valores basales.

C/EBP $\beta$  actúa como un factor de transcripción uniéndose a secuencias específicas del DNA (secuencia consenso: TTG/ACGC/TAA) (Kfoury and Kapat, 2009). Como hemos comentado anteriormente encontramos dicha secuencia en las posiciones -616/-599 y -108/-94 del promotor de C3. Por lo tanto analizamos si estas secuencias eran las responsables del efecto observado; para ello generamos dos construcciones: una en la que estaba deleccionado el sitio A (P.C3/297) y otra en la que ambos sitios, A y B (P.C3/121) estaban deleccionados (**Figura 12**) y estudiamos el efecto de C/EBP $\beta$  sobre su actividad promotora. Nuestros resultados muestran que la construcción P.C3/297 tiene una leve respuesta a C/EBP $\beta$  habiendo perdido, por tanto, la mayor parte de la respuesta del promotor a dicho factor de transcripción sugiriendo que los sitios A y B son esenciales

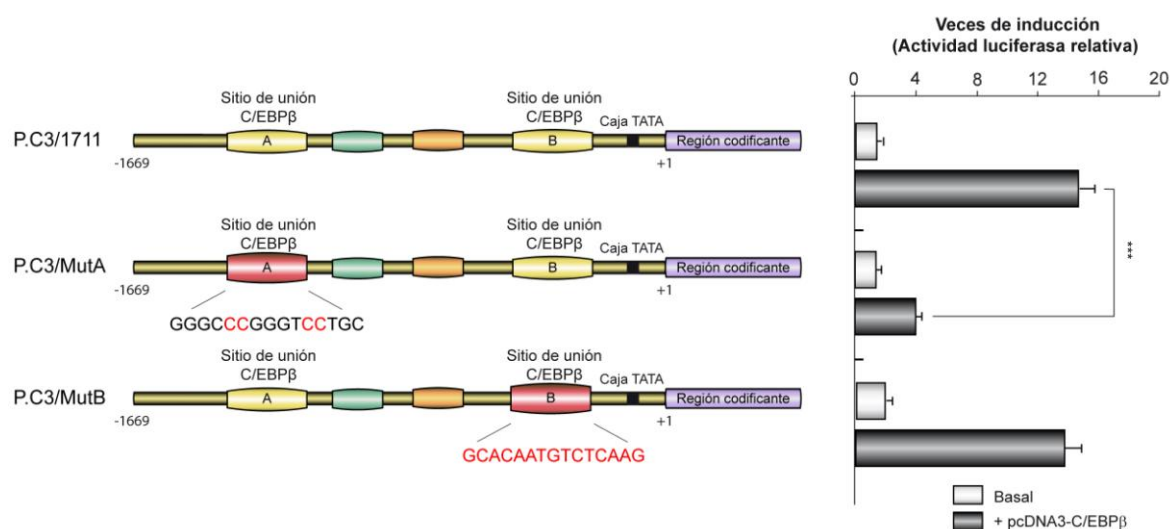


para la respuesta de C/EBP $\beta$ . Por otra parte no se observó respuesta alguna a C/EBP $\beta$  con la construcción P.C3/121 (**Figura 12**). Estos resultados indican que en las zonas delecionadas se encuentran los elementos clave responsables de la activación de la expresión de C3 por C/EBP $\beta$ . El hecho de que la inducción de la expresión del promotor de C3 por C/EBP $\beta$  desaparezca casi totalmente utilizando la construcción P.C3/297 sugiere que el sitio consenso para C/EBP $\beta$  situado más 5' (sitio A) es el principal responsable de su efecto sobre C3.



**Figura 12. Efecto de C/EBP $\beta$  sobre la actividad del promotor de C3.** Se analizó el efecto de C/EBP $\beta$  sobre la actividad del promotor de C3 utilizando las construcciones P.C3/1711, P.C3/297 y P.C3/121, tal como se indica en Materiales y Métodos. Los datos de actividad de la luciferasa se corrigieron por la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa. Los valores obtenidos se expresan con respecto a la actividad luciferasa en ausencia del plásmido de sobreexpresión pcDNA3-C/EBP $\beta$ . Se muestra el valor medio  $\pm$  DS de al menos 5 experimentos distintos por triplicado. \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Con el fin de comprobar más en detalle si las secuencias consenso de unión a C/EBP $\beta$  localizadas en las posiciones -616/-599 y entre -108/-94 del promotor de C3, eran las responsables del efecto observado, mutamos estas secuencias y determinamos su efecto sobre la regulación del promotor por C/EBP $\beta$ . Nuestros resultados muestran (**Figura 13**) que la mutación del sitio A provoca una disminución drástica del efecto de C/EBP $\beta$ . Por el contrario la mutación del sitio B apenas tuvo efecto sobre la actividad de dicho factor de transcripción. Estos resultados están de acuerdo con los estudios de deleción que mostraban también una drástica disminución de la actividad de C/EBP $\beta$  cuando se elimina el sitio A (**Figura 12**).



**Figura 13. Efecto de la mutación de los sitios A y B del promotor de C3 sobre la acción de C/EBPβ.** Se analizó el efecto de C/EBPβ sobre la actividad del promotor de C3 utilizando las construcciones P.C3/1711, P.C3/Mut A y P.C3/Mut B, tal como se indica en Materiales y Métodos. Los datos obtenidos de actividad luciferasa se corrigieron por la actividad de la β-galactosidasa. Los valores se expresan con respecto a la actividad luciferasa en ausencia del plásmido de sobreexpresión pcDNA3-C/EBPβ. Se muestra el valor medio  $\pm$  DS de al menos 5 experimentos distintos. \*\*\* $p \leq 0,001$ .

#### 4. Regulación de la expresión de C3 y C/EBPβ *in vivo*.

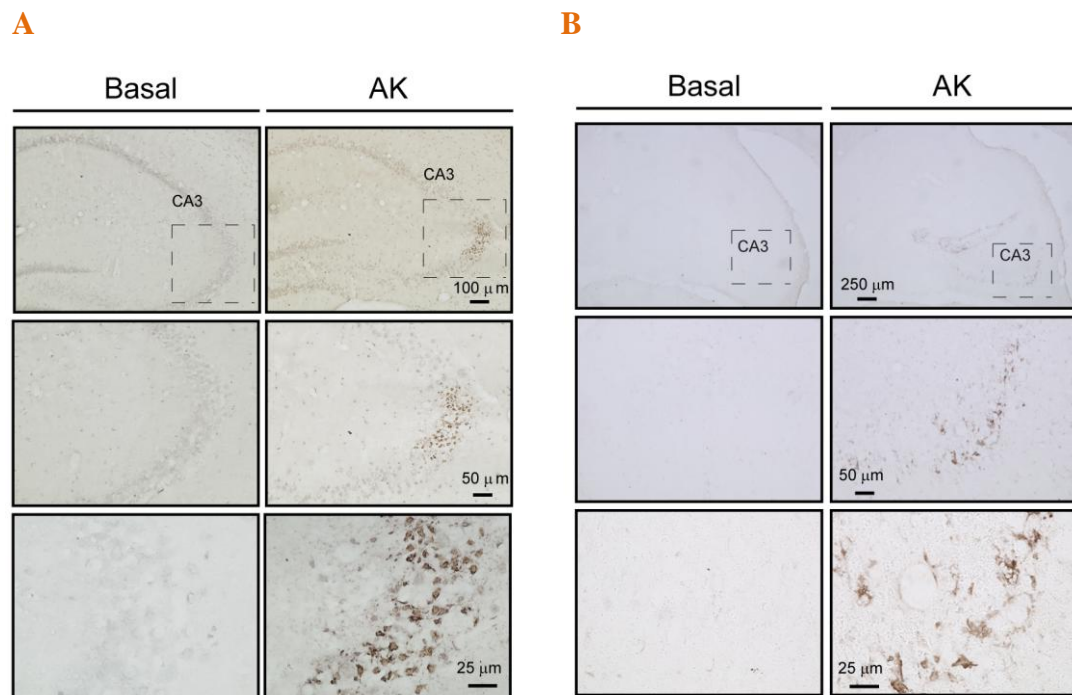
Datos previos de nuestro laboratorio demuestran que C/EBPβ tiene un papel fundamental *in vivo* como mediador en el daño neurológico inducido por procesos excitotóxicos (Cortes-Canteli et al., 2008). Observamos que ratones que carecen de C/EBPβ son menos susceptibles a la activación glial y al daño neuronal que se producen tras la inyección de AK en el hipocampo. En este apartado hemos analizado el posible papel mediador de C3 en los efectos de C/EBPβ en procesos excitotóxicos.

##### 4.1. Neurodegeneración hipocampal inducida por AK.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que ratones KO para C/EBPβ inyectados con AK presentaban una respuesta inflamatoria reducida y exhiben menor muerte neuronal en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, en comparación con los Wt (Cortes-Canteli et al., 2008). En vista de estos resultados junto con los estudios *in vitro*

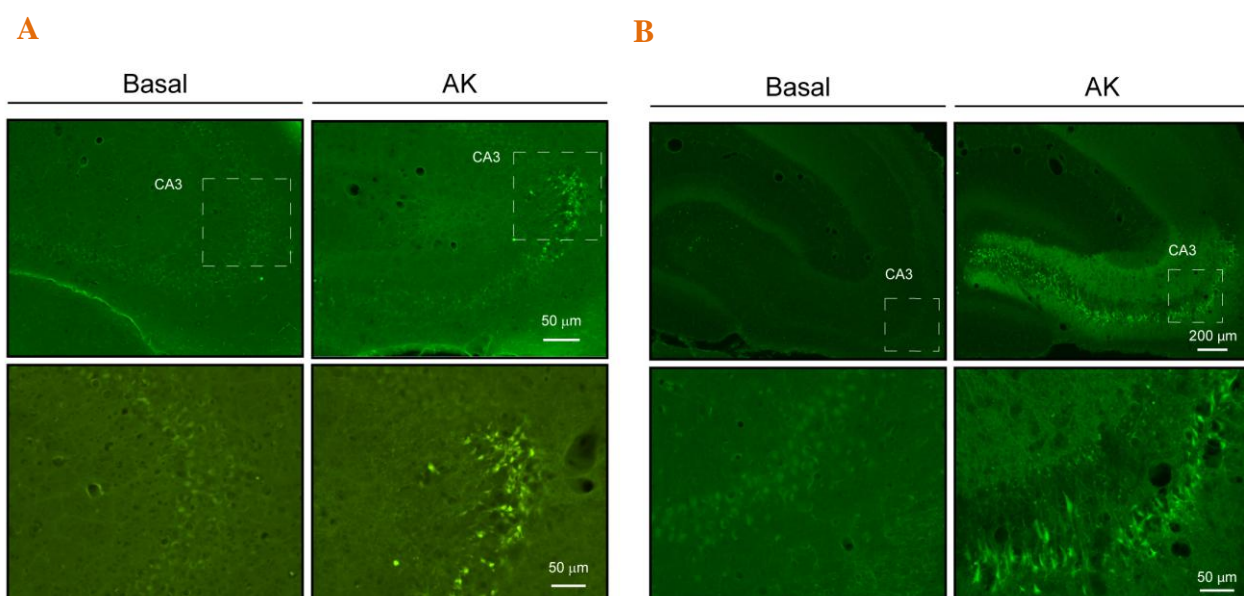
sobre C3 presentados en este trabajo analizamos el posible papel de esta proteína del complemento en estos procesos.

Inicialmente analizamos el daño neuronal producido en hipocampo por la inyección de AK mediante estudios de TUNEL y tinción con Fluoro Jade. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 14**, y como puede observarse, en la región CA3 tanto en hipocampo de ratón (**Figura 14A**) como de rata (**Figura 14B**) AK provoca un claro aumento en el marcaje TUNEL indicando un incremento de células apoptóticas en esta región del hipocampo en ambas especies.



**Figura 14. Inducción por AK de muerte celular por apoptosis en el hipocampo de ratón y rata.** Ratones (A) y ratas (B) controles se inyectaron en el hipocampo con AK o vehículo y a las 72 h se sacrificaron y sus cerebros fueron procesados como se indica en Materiales y Métodos. Cortes coronales se tiñeron mediante inmunohistoquímica de TUNEL. Imágenes representativas de al menos 3 experimentos. La región ampliada corresponde a la región CA3.

La tinción con Fluoro Jade, que marca neuronas en proceso de degeneración, muestran claramente (**Figura 15**) que la inyección con AK induce daño neuronal en la región CA3 del hipocampo.

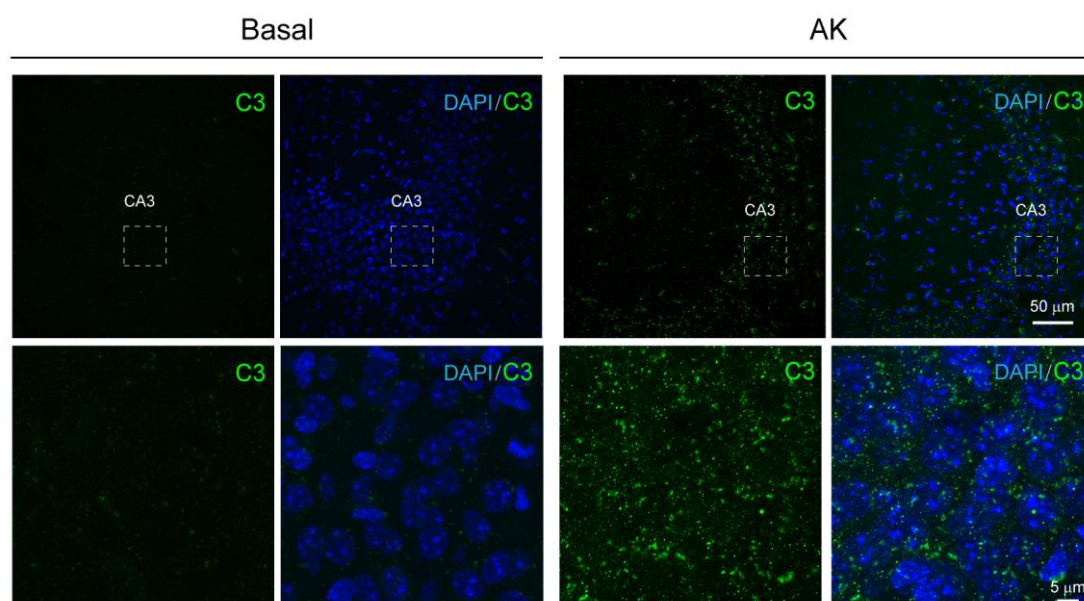


**Figura 15. Neuronas en degeneración detectadas en hipocampo 72 horas tras inyección con AK.**

Estudio de neurodegeneración mediante la tinción con Fluoro-jade B en la región CA3 del hipocampo de ratón **(A)** y de rata **(B)**. Las imágenes a más aumento muestran las zonas ampliadas de la región CA3.

#### 4.2. Inducción por AK de la expresión de C3 y C/EBP $\beta$ en el hipocampo de ratón

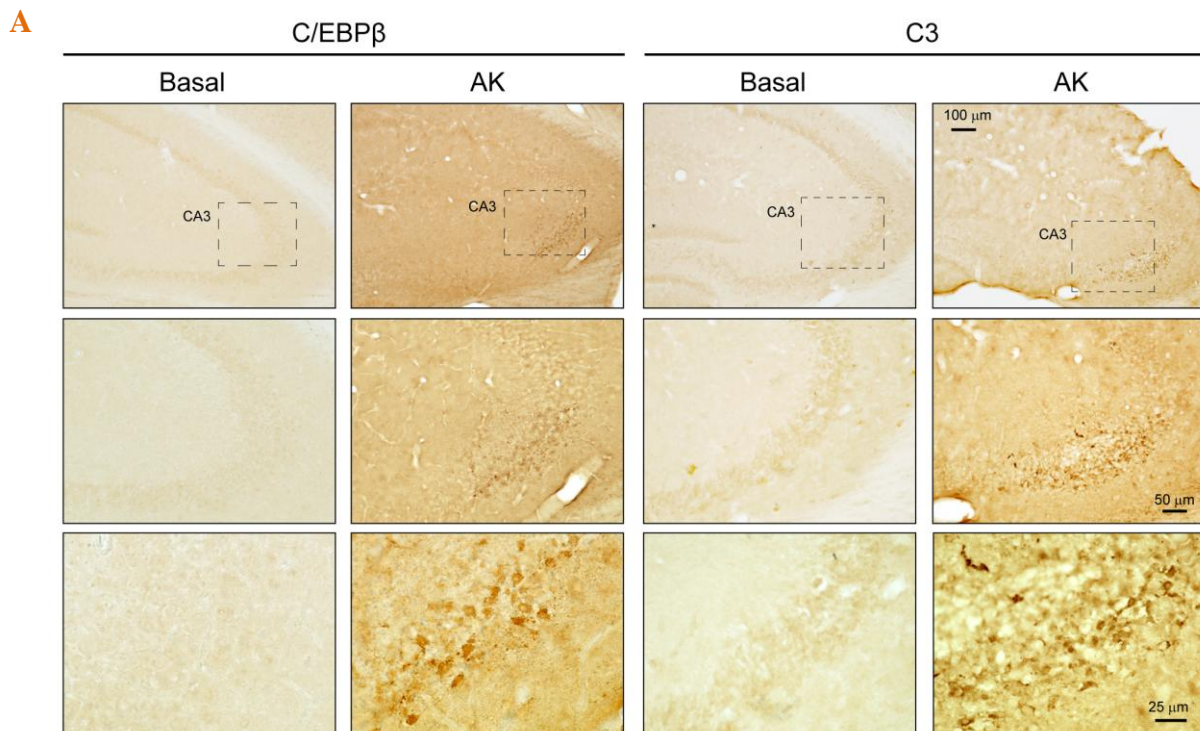
Con respecto a la expresión de C3 nuestros resultados mostraron que ésta aumentaba significativamente en el hipocampo de ratones inyectados con AK en comparación con los animales controles inyectados con vehículo. En la **Figura 16** se muestran estos resultados en el área CA3 del hipocampo, que es donde fundamentalmente se observa este aumento.

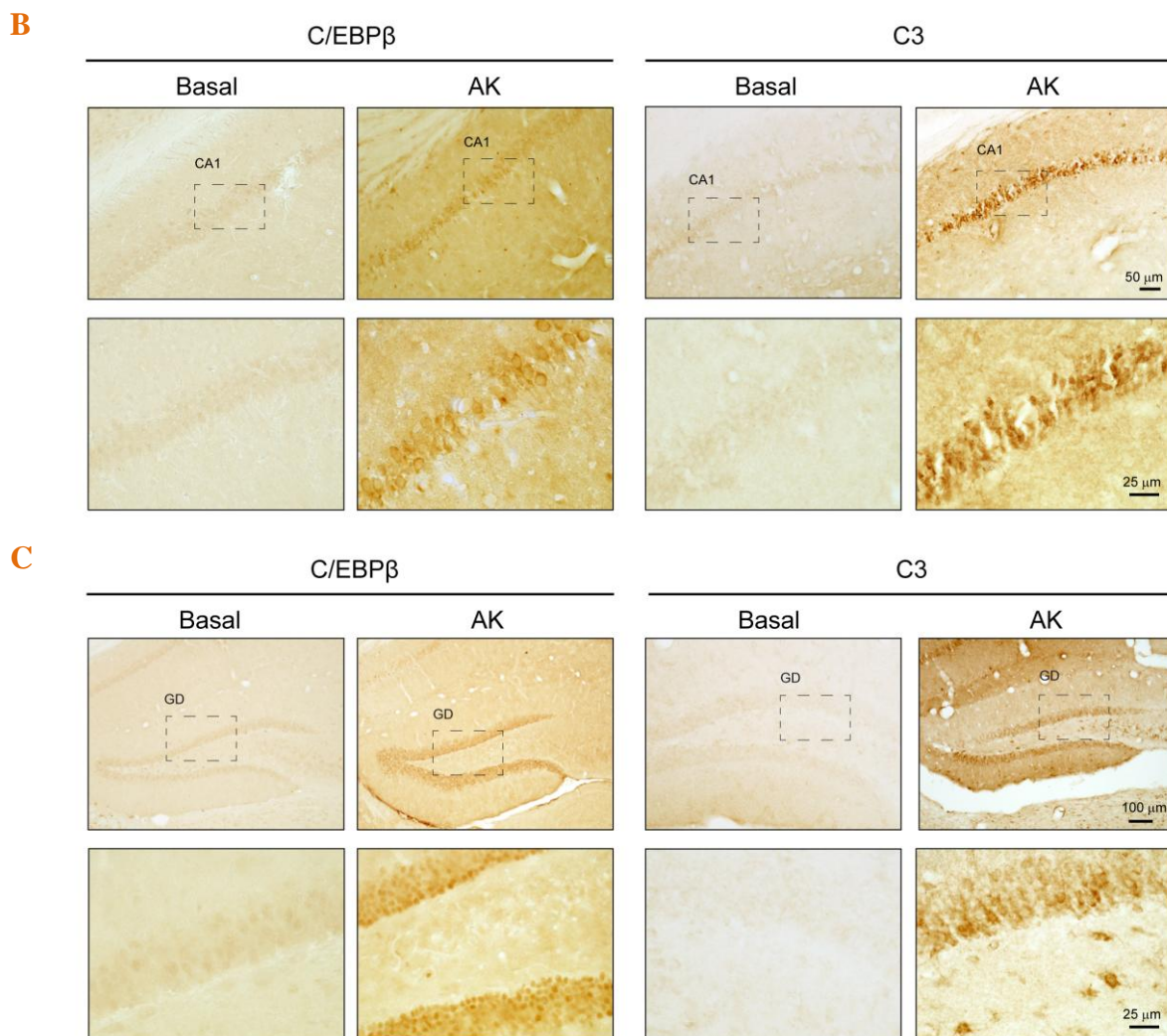




**Figura 16. Inducción por AK de la expresión de C3 en la región CA3 del hipocampo de ratón.** Ratones controles se inyectaron con AK o vehículo y a las 72 h se sacrificaron y los cerebros se procesaron tal como se indica en Materiales y Métodos. Se tiñeron secciones coronales con anticuerpos específicos contra C3 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos diferentes. Los paneles inferiores muestran imágenes a mayor aumento.

Con respecto a la expresión de C/EBP $\beta$ , sabíamos por estudios anteriores que la administración de AK aumentaba los niveles de esta proteína en la zona del giro dentado del hipocampo (Cortes-Canteli et al., 2008). En este estudio mostramos que los niveles de C/EBP $\beta$  aumentan también en la zona CA3. Como se muestra en la **Figura 17A** tras la inyección de AK se produce un aumento en la expresión de C/EBP $\beta$  en la misma región donde tiene lugar el aumento en los niveles de C3, tal como se puede observar en cortes contiguos. A continuación analizamos otras zonas del hipocampo. Como se puede ver en la **Figura 17** existe también un aumento de la expresión de C/EBP $\beta$  y C3 en CA1 (**Figura 17B**) y giro dentado (GD) (**Figura 17C**) del hipocampo.

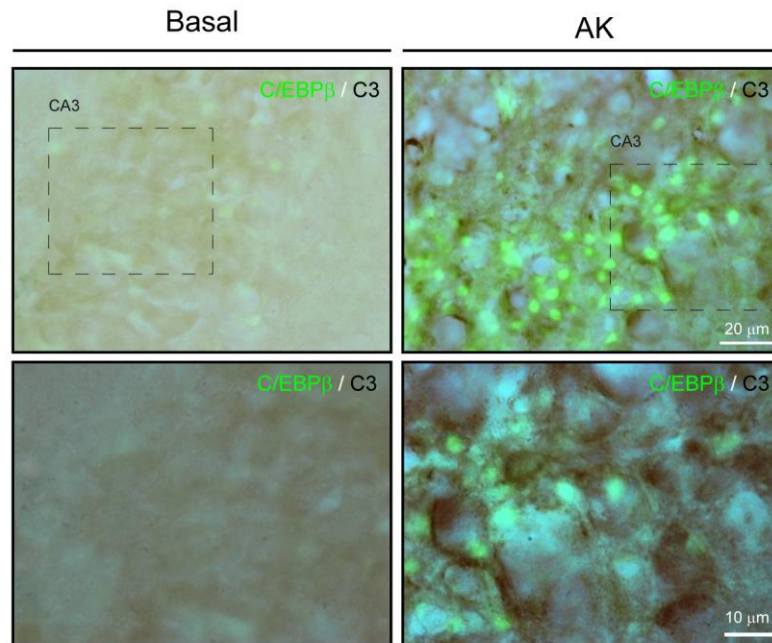




**Figura 17. Inducción por AK de la expresión de C/EBP $\beta$  y C3 en las regiones CA3, CA1 y giro dentado del hipocampo de ratón.** Ratones controles se inyectaron con AK o vehículo y a las 72 h se sacrificaron y los cerebros se procesaron tal como se indica en Materiales y Métodos. Se tiñeron secciones coronales contiguas con anticuerpos específicos contra C/EBP $\beta$  y C3: **(A)** región CA3, **(B)** región CA1 y **(C)** giro dentado (GD) del hipocampo. Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos diferentes. Los paneles inferiores muestran imágenes a mayor aumento.

Dado que nuestros resultados claramente muestran que la inducción de la expresión de C/EBP $\beta$  y C3 por AK ocurre en las mismas regiones del hipocampo, decidimos llevar a cabo estudios inmunohistoquímicos de doble tinción para ver si C/EBP $\beta$  y C3 se expresaban en las mismas células. Teñimos C3 con DAB y C/EBP $\beta$  con

inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos. Los resultados se muestran en la **Figura 18** donde se observa como C3 colocaliza con C/EBP $\beta$  en las mismas células.



**Figura 18. Colocalización de C3 y C/EBP $\beta$  en la región CA3 del hipocampo de ratón.** Ratones controles se inyectaron con AK o vehículo y a las 72 h se sacrificaron y los cerebros se procesaron tal como se indica en Materiales y Métodos. Se tiñeron las mismas secciones coronales mediante inmunohistoquímica de DAB para C3 y mediante tinción de inmunofluorescencia (verde) para C/EBP $\beta$ . Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos diferentes. Los paneles inferiores muestran imágenes a mayor aumento.

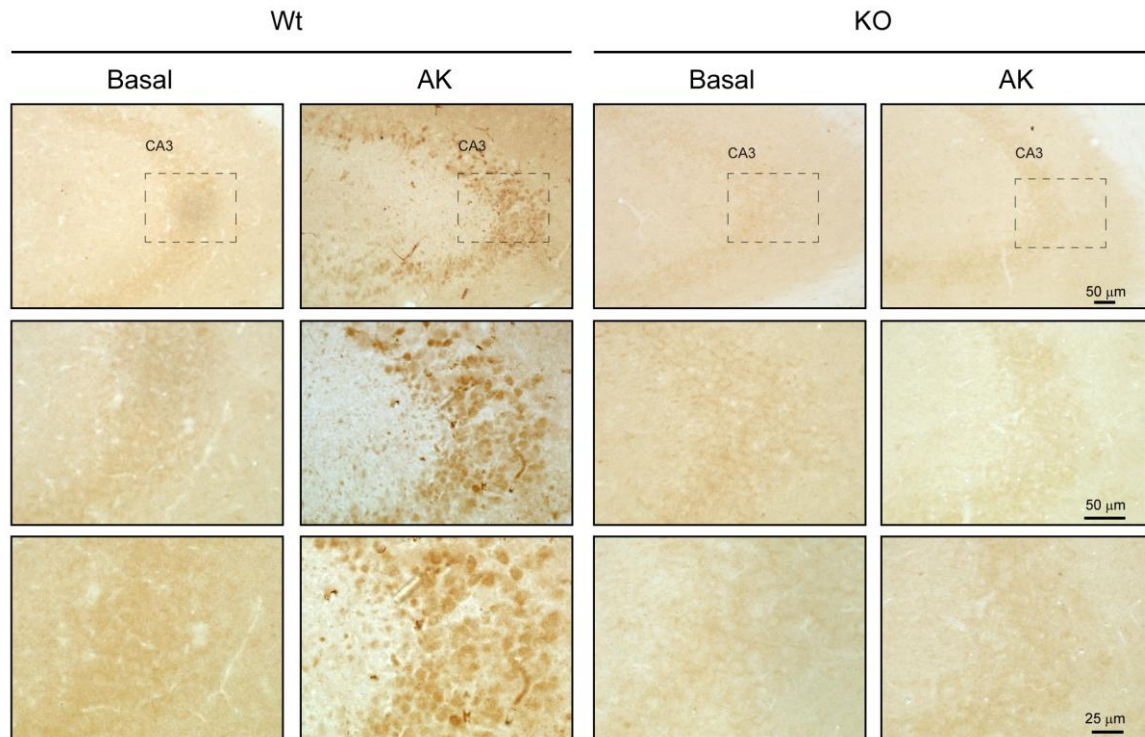
Los resultados mostrados hasta ahora, junto con los datos obtenidos con el análisis de microarrays utilizando tejido aislado de hipocampo de ratón, sugieren que, igual que ocurre *in vitro*, C/EBP $\beta$  regula la expresión de C3 en el hipocampo de ratones adultos después de un daño excitotóxico.

Para confirmar que en efecto C/EBP $\beta$  regula la expresión de C3 *in vivo*, analizamos también su expresión en ratones carentes de C/EBP $\beta$  inyectados o no con AK. Como se puede observar en la **Figura 19** la inyección de AK en el hipocampo de ratones silvestres indujo el esperado aumento en la expresión de C3 en las zonas CA3, CA1 y GD. Este aumento sin embargo no se produjo en aquellos ratones deficientes en C/EBP $\beta$ , indicando que en efecto el aumento en la expresión de C3 después de una lesión excitotóxica está

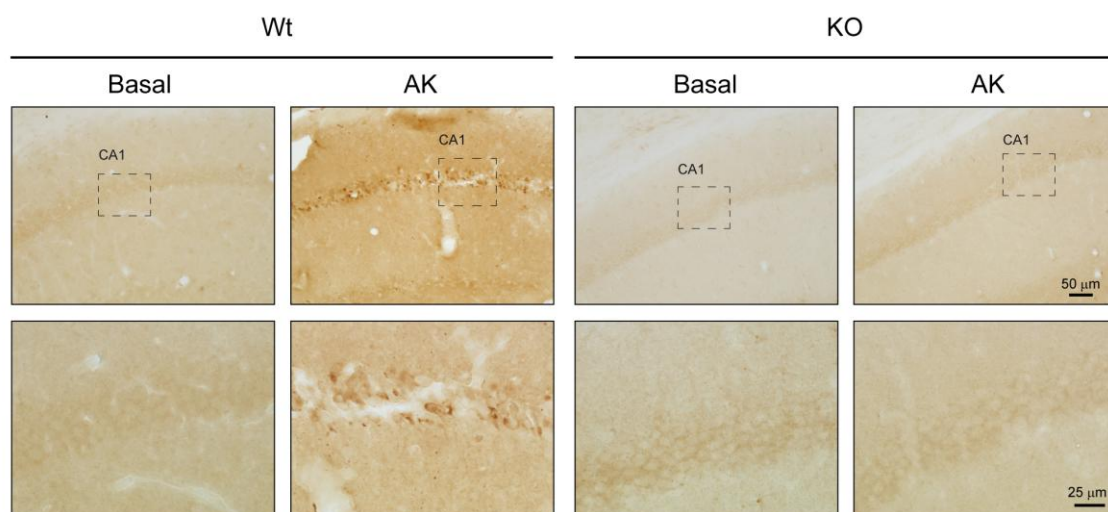


regulado por C/EBP $\beta$ . Estos datos también sugieren de nuevo que C3 sería un posible mediador de los efectos de C/EBP $\beta$  en la activación glial y muerte neuronal que se produce en el hipocampo tras un daño excitotóxico.

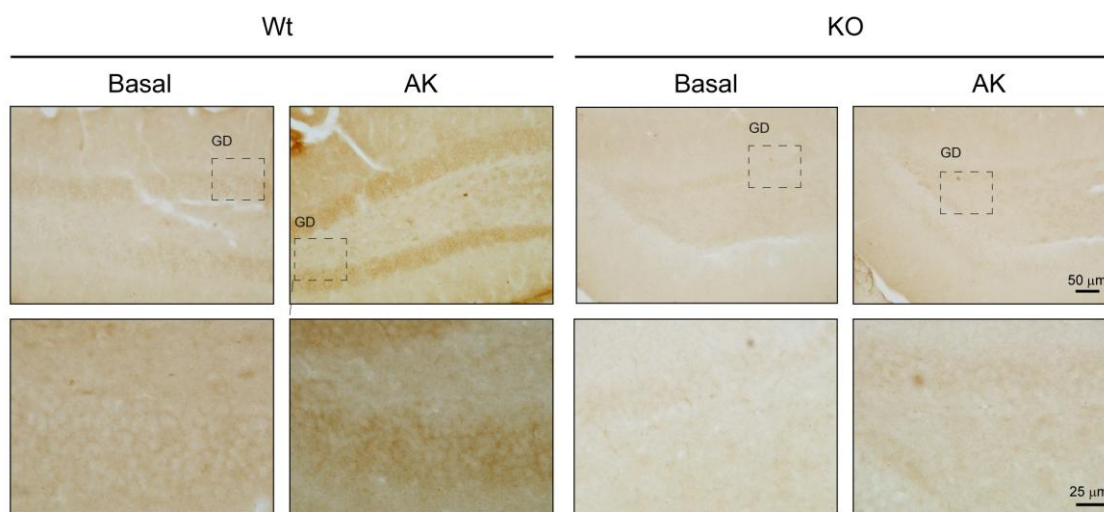
**A**



**B**





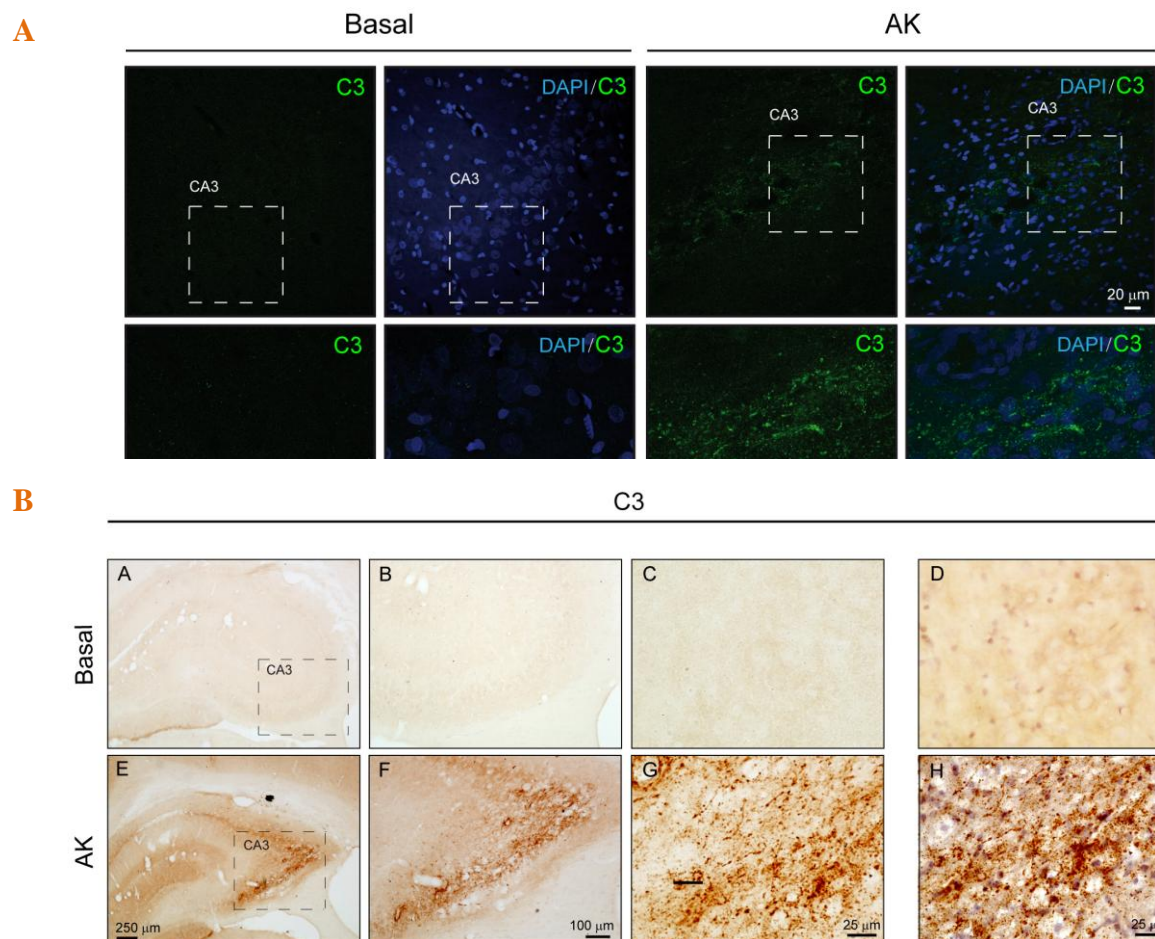
**C**

**Figura 19. Efecto del AK sobre la expresión de C3 en el hipocampo de ratones carentes de C/EBPβ.**

Ratones C/EBPβ<sup>+/+</sup> y C/EBPβ<sup>-/-</sup> se inyectaron con AK o vehículo y a las 72 h se sacrificaron y los cerebros se procesaron tal como se indica en Materiales y Métodos. Se tiñeron secciones coronales con anticuerpos específicos contra C3. **(A)** Región CA3, **(B)** región CA1 y **(C)** giro dentado (GD) del hipocampo. Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos diferentes. Los paneles inferiores muestran imágenes a mayor aumento.

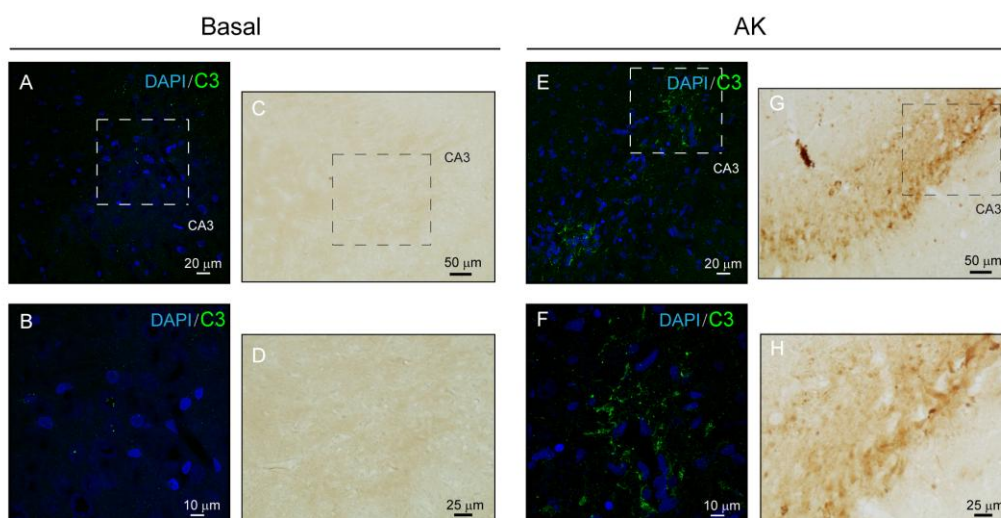
#### **4.3. Efecto del AK sobre la expresión de C3 y C/EBPB en el hipocampo de rata**

Posteriormente estudiamos si esta regulación de C3 por C/EBPβ *in vivo* tenía lugar también en la rata, ya que los estudios *in vitro* mostrados en el apartado 2.1 de Resultados así lo sugieren. Para ello utilizamos el mismo modelo de excitotoxicidad (inyección de AK directamente en el hipocampo de animales adultos) utilizado en ratón. Setenta y dos horas después de la lesión, los cerebros se procesaron como se indica en Materiales y Métodos y se realizaron estudios de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (DAB) **(Figura 20)** en cortes coronales de cerebro de rata. Al igual que ocurre en ratón, la inyección estereotáxica de AK en el hipocampo de ratas adultas induce un aumento significativo de los niveles de proteína C3 en la zona CA3 del hipocampo. Con el fin de estudiar la localización intracelular de C3, realizamos tinciones con DAPI o hematoxilina **(Figura 20)** para teñir los núcleos celulares. En ambas figuras se observa que C3 se localiza fundamentalmente en el citoplasma.



**Figura 20. Inducción por AK de la expresión de C3 en la región CA3 del hipocampo.** Ratas controles se inyectaron con AK o vehículo y a las 72 h se sacrificaron y los cerebros se procesaron tal como se indica en Materiales y Métodos. **(A)** Se tiñeron secciones coronales con anticuerpos fluorescentes específicos contra C3 (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). **(B)** Se tiñeron otras secciones coronales con anticuerpos específicos contra C3 en DAB. Las imágenes D y H muestran núcleos teñidos con hematoxilina. Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos diferentes. Los paneles B, C, F y G muestran imágenes a mayor aumento.

A continuación, e igual que hicimos en los estudios en ratón, en este caso realizamos análisis de inmunofluorescencia para C3 e inmunohistoquímica (DAB) para C/EBP $\beta$ , en cortes contiguos de cerebro de ratas inyectadas o no con AK utilizando anticuerpos específicos contra ambas proteínas. Los resultados mostrados en la **Figura 21** indican que, al igual que observamos en ratón, tras la inyección de AK tanto C/EBP $\beta$  como C3 se localizan en la misma zona CA3 del hipocampo.



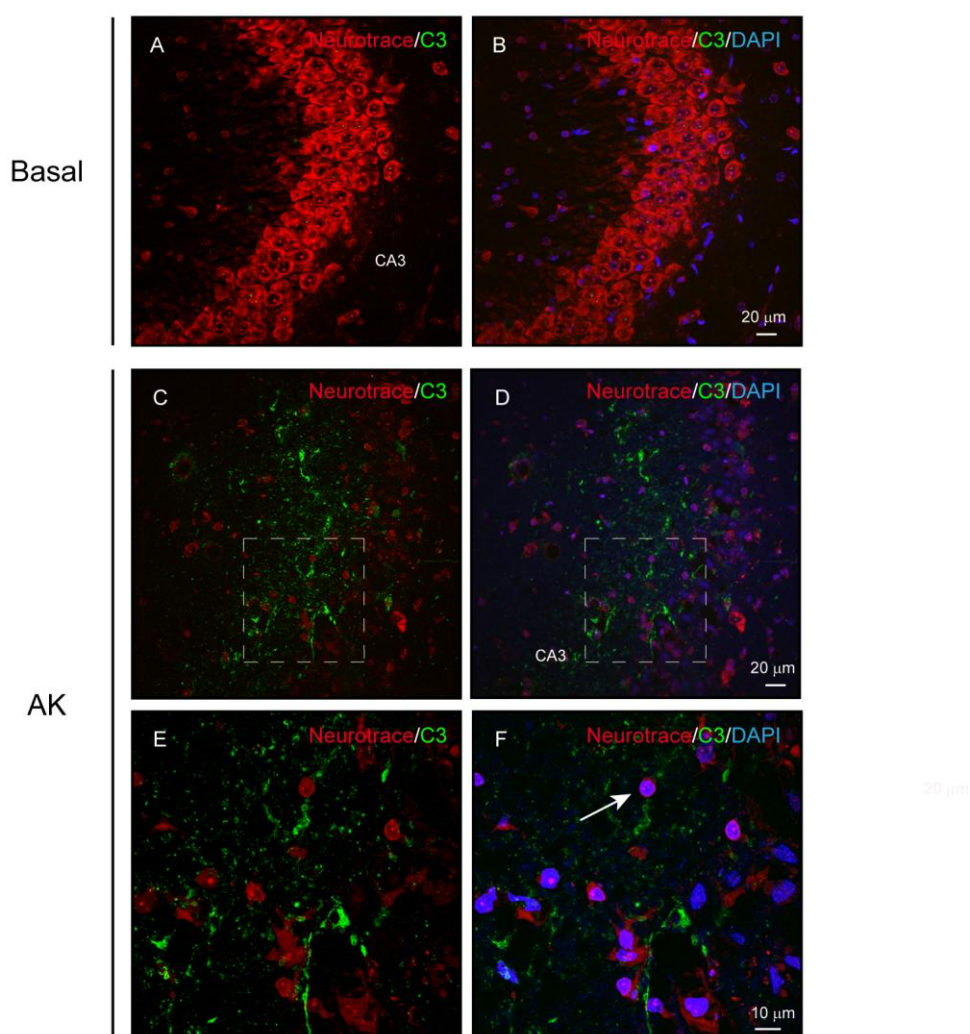
**Figura 21. Inducción por AK de la expresión de C3 y C/EBPβ en la región CA3 del hipocampo de rata.**

Ratas controles se inyectaron con AK o vehículo y a las 72 h se sacrificaron y los cerebros se procesaron tal como se indica en Materiales y Métodos. Se tiñeron secciones coronales contiguas con anticuerpos específicos contra C3 (verde) (A, B, E y F) y C/EBPβ en DAB (C, D, G y H). Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos diferentes. Los paneles inferiores muestran imágenes a mayor aumento.

#### **4.4. Análisis de los tipos celulares del hipocampo de rata donde C3 se induce por AK.**

Finalmente, para analizar en qué tipo celular se producía el aumento en los niveles de C3, realizamos estudios de doble tinción con anticuerpos específicos para C3 y proteína ácida fibrilar glial (GFAP), tomato lectin o Neurotrace, para identificar astrocitos, microglía y neuronas respectivamente.

Los estudios de doble tinción utilizando el anticuerpo específico anti-C3 y Neurotrace indicaron que, 72 h tras la inyección hipocampal de AK, se produce un fuerte incremento de muerte neuronal en la región CA3 y que en dicha región tiene lugar una acumulación de C3 (**Figura 22**). En los paneles inferiores de esta figura donde se muestran mayores aumentos de las imágenes se puede observar que C3 se localiza tanto en el interior como en el exterior de las neuronas. Dada la masiva muerte neuronal que se produce en esta zona del hipocampo, estos resultados sugieren que C3 se localiza en aquellas neuronas que están degenerando.

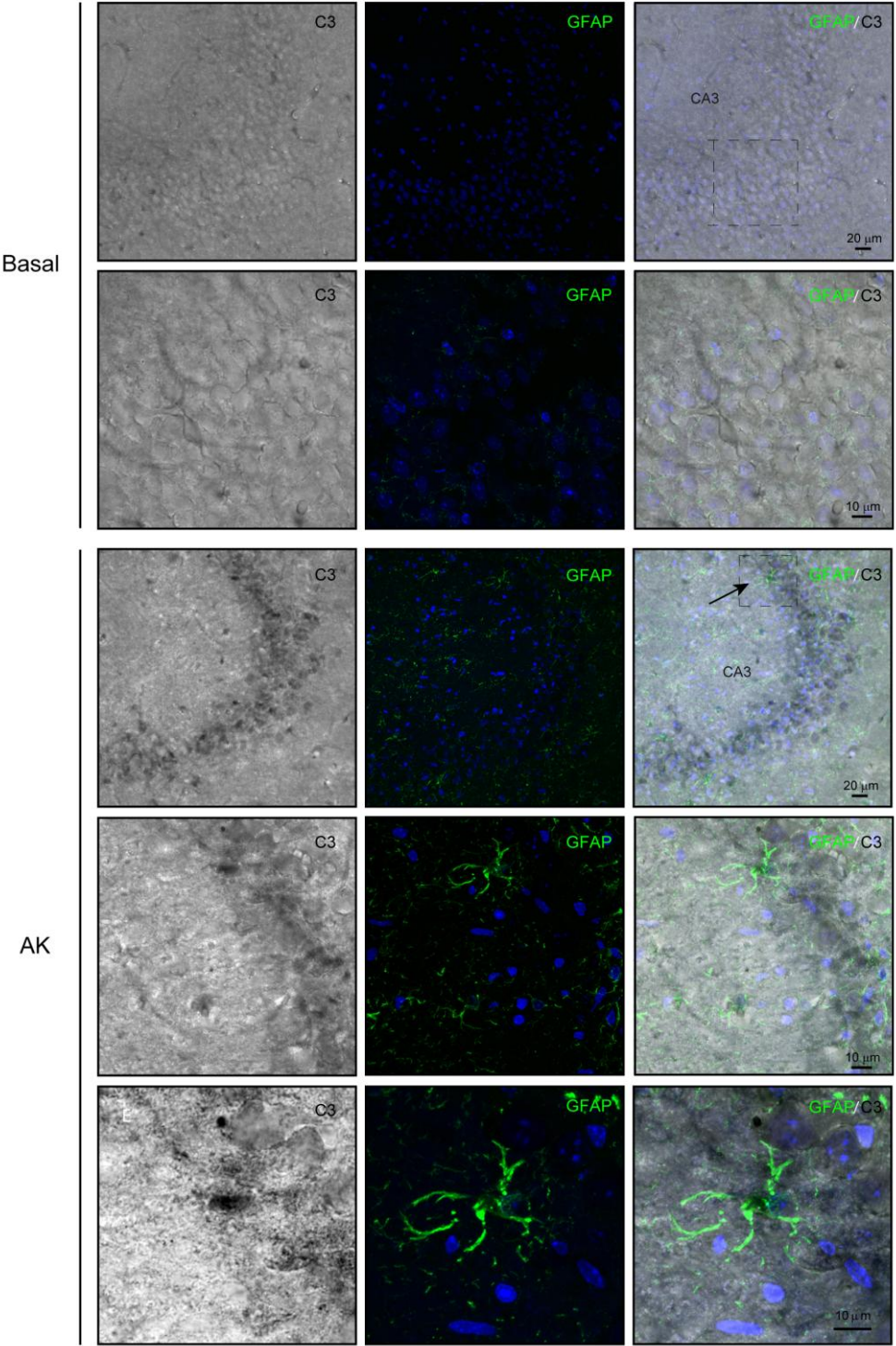


**Figura 22. Inducción por AK de la expresión de C3 en la región CA3 del hipocampo de rata.** Ratas controles se inyectaron con AK o vehículo y a las 72 h se sacrificaron y los cerebros se procesaron tal como se indica en Materiales y Métodos. Se tiñeron secciones coronales con anticuerpos específicos contra C3 (verde) y NEUROTRACE (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos diferentes. Los paneles E y F muestran imágenes a mayor aumento de C y D.

Como hemos comentado en la Introducción, uno de los acontecimientos que tiene lugar en el hipocampo después de un daño excitotóxico es la activación secuencial de la microglía y la astrogliá. Esta activación glial contribuye en gran medida a la pérdida neuronal que se produce tras este tipo de lesión. Por tanto estudiamos también si C3 se expresaba en glía activada, tanto astrocitos como microglía.



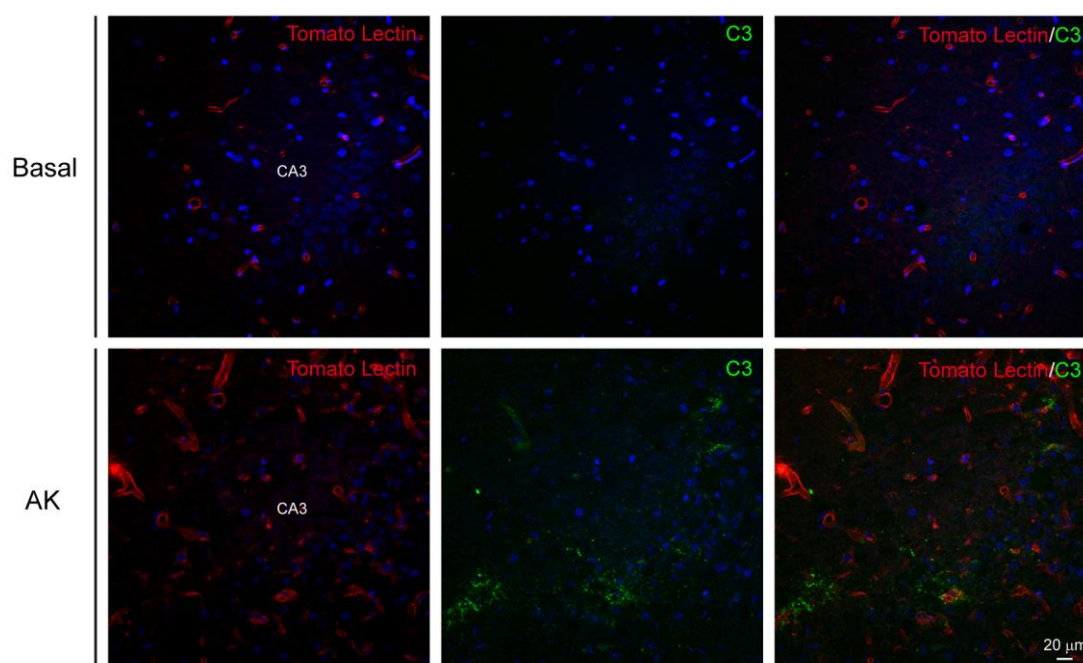
Como era de esperar, observamos un aumento en el número de astrocitos reactivos en la región CA3 del hipocampo de rata 72 h tras la inyección con AK (**Figura 23**). Observamos también que C3 se acumula en el cuerpo celular de estos astrocitos.



**Figura 23. Inducción por AK de la expresión de C3 y GFAP en la región CA3 del hipocampo de rata.**

Ratas controles se inyectaron con AK o vehículo y a las 72 h se sacrificaron y los cerebros se procesaron tal como se indica en Materiales y Métodos. Se tiñeron secciones coronales con anticuerpos específicos contra C3 (en DAB) y GFAP (verde). Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos diferentes. Los paneles inferiores muestran imágenes a mayor aumento.

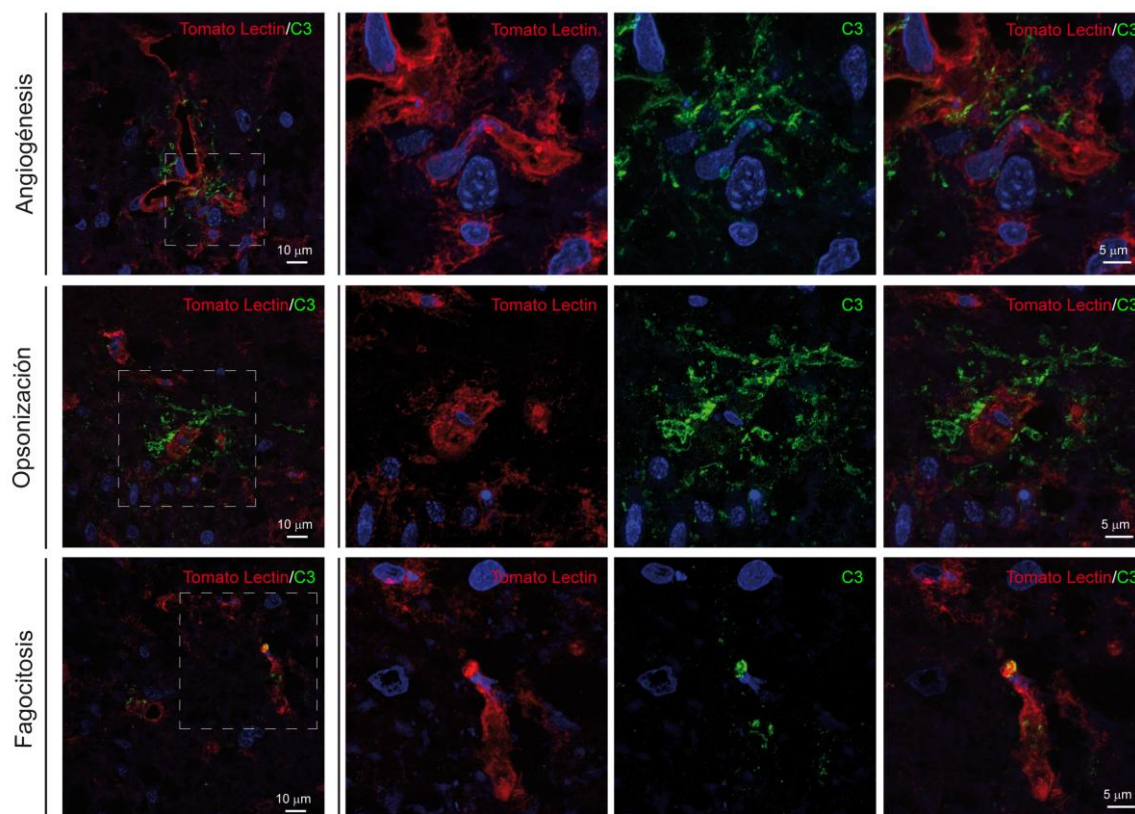
También detectamos un aumento significativo de la activación microglial después de la lesión con AK. El análisis de las secciones coronales de cerebro de rata nos reveló un aumento de células de microglía, una mayor vascularización y un incremento de C3 en la región CA3 72h tras la inyección con AK (**Figura 24**).



**Figura 24. Inducción por AK de la expresión de C3 en la microglía de la región CA3 del hipocampo de**

**rata.** Ratas controles se inyectaron con AK o vehículo y a las 72 h se sacrificaron y los cerebros se procesaron tal como se indica en Materiales y Métodos. Se tiñeron secciones coronales con anticuerpos específicos contra C3 (verde) y tomato lectin (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos diferentes. Los paneles inferiores muestran imágenes a mayor aumento.

En una ampliación de las imágenes obtenidas con el microscopio confocal de la región CA3 del hipocampo inyectado con AK, se observa inmunoreactividad para C3 en las inmediaciones de células de microglía, con localización extracelular (**Figura 25**).



**Figura 25. Inducción por AK de la expresión de C3 y tomato lectin en la región CA3 del hipocampo de rata.** Ratas controles se inyectaron con AK o vehículo y a las 72 h se sacrificaron y los cerebros se procesaron tal como se indica en Materiales y Métodos. Se tiñeron secciones coronales con anticuerpos específicos contra C3 (verde) y tomato lectin (rojo). Se observa localización extracelular de C3 junto a vasos (angiogénesis), y junto a células de microglía que sugiere marcaje de restos celulares (opsonización) para su posterior captura (fagocitosis). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos diferentes. Los paneles de la derecha muestran imágenes a mayor aumento.







## Discusión



### *Implicación de C/EBPβ en procesos inflamatorios en el hipocampo*

Como se ha comentado en la Introducción, nuestro conocimiento del papel de C/EBPβ en el cerebro de mamíferos se ha ampliado notablemente en la última década. Sin embargo, a diferencia de lo que pasa en otros tejidos como tejido adiposo o hígado, no se tienen muchos datos de los genes regulados por C/EBPβ en células neurales. Menard y cols (Menard et al., 2002) en un trabajo en el que demostraron que C/EBPβ era esencial para la neurogénesis cortical, sugerían también que este factor de transcripción activaba directamente la transcripción de genes específicos neuronales como la Tα1 α-tubulina. También los estudios llevados a cabo por Fuentealba y cols (Fuentealba et al., 2004) parecen indicar que C/EBPβ está implicada en la activación de Ciclina D3 que tiene lugar en células de Schwann en respuesta a forskolina y heregulina. En trabajos anteriores nuestro laboratorio mostró mediante análisis de microarrays que la sobreexpresión de C/EBPβ en células de neuroblastoma de ratón (células TR) induce la expresión de genes implicados en inflamación y daño cerebral (Cortes-Canteli et al., 2004). De acuerdo con esto, estudios posteriores también indicaron que ratones carentes de C/EBPβ son menos sensibles al daño hipocampal inducido por ácido kaínico ya que mostraban una notable reducción en la respuesta inflamatoria inducida por dicho agente (Cortes-Canteli et al., 2008). Los estudios de microarray de hipocampo de ratón realizados en este trabajo concuerdan con los datos anteriores y amplían los conocimientos que tenemos sobre el papel de C/EBPβ en inflamación. La expresión de genes neuroprotectores, como ADNP y PENK1 (**Tabla 2**) está aumentada en ratones *C/EBPβ*<sup>-/-</sup>. Por el contrario, la expresión de genes implicados en procesos neurodegenerativos, inflamatorios o de daño cerebral está claramente disminuida en el hipocampo de ratones *C/EBPβ*<sup>-/-</sup> en comparación con ratones controles *C/EBPβ*<sup>+/+</sup>. Tal es el caso de LZP-S, ALOX-5, SLC7A8, BBOX1, SLC25A37 y C3 (**Tabla 1**).

ADNP es un miembro de la familia de factores neurotróficos inducidos por VIP (péptido intestinal vasoactivo). Este gen se expresa ampliamente en cerebro, y su fragmento activo NAP tiene propiedades anti-oxidantes (Zamostiano et al., 2001) y neuroprotectoras frente a diversos agentes citotóxicos *in vivo* (Alcalay et al., 2004, Bassan et al., 1999, Beni-Adani et al., 2001, Gozes et al., 2000, Rotstein et al., 2006, Zemlyak et al., 2009), y en modelos animales de enfermedad de Alzheimer (Gozes et al., 2009), daño traumático (Gozes et al., 2005), e hipoxia (Greggio et al., 2009).

PENK1 es un gen que codifica la proteína proencefalina, precursor de las Met- y Leu-encefalinas (Noda et al., 1982). Los niveles en cerebro de RNA de PENK1 están disminuidos en un modelo murino de enfermedad de Huntington (Sun et al., 2002b) y en muestras tomadas *post mortem* de pacientes con Alzheimer (Taylor et al., 1986). Diversos estudios muestran también que ratones que carecen de la expresión de PENK1 presentan elevados niveles de ansiedad (Bilkei-Gorzo et al., 2007) y Wilson y col observaron que la infección con un herpes virus conteniendo el cDNA de Penk1 disminuye la hiperalgesia en ratones (Wilson et al., 1999).

LZP-S es una lisozima secretada por macrófagos y por el epitelio pulmonar, y es una de las proteínas antibacterianas más abundante en las vías aéreas (Thompson et al., 1990). Los niveles de esta lisozima están elevados en el fluido cerebroespinal de pacientes con enfermedades inflamatorias del SNC como meningitis, encefalitis y esclerosis múltiple (Hansen et al., 1977, Hallgren et al., 1982). LZP-S se sobreexpresa en ratones con fenilcetonuria, una enfermedad metabólica donde la acumulación de fenilalanina conduce a un retraso mental y psicomotor severo (Oh et al., 2005). También se ha observado la expresión de esta lisozima en células que expresan C/EBP $\beta$ , como las células gliales olfatorias y las células de Schwann (Vincent et al., 2005).

ALOX-5 es una enzima que se expresa ampliamente en cerebro y está implicada en la biosíntesis de leukotrienos proinflamatorios, cuyos niveles aumentan tras un daño cerebral. Esta enzima se sobreexpresa en enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad (Uz et al., 1998). Ge y col. han sugerido que la activación de esta enzima está mediada por los receptores NMDA (Ge et al., 2006) y se ha observado que su expresión aumenta en el hipocampo de ratas inyectadas con AK (Manev et al., 2000). Por el contrario, la inhibición de esta enzima es neuroprotectora (Zhang et al., 2006, Ain et al., 2013, Shi et al., 2013). En este sentido Song y col. han mostrado que la minociclina, una tetraciclina sintética neuroprotectora, ejerce su efecto inhibiendo la expresión de ALOX5 (Song et al., 2006).

SLC7A8 es un transportador de aminoácidos (Bassi et al., 1999) y se expresa en diversos órganos, entre ellos en el cerebro (Braun et al., 2011). El flujo de glutamina está mediado por este transportador, y se ha sugerido que SLC7A8 podría tener un importante papel en el reciclaje de glutamato y GABA en el cerebro (Deitmer et al., 2003).

BBOX1 es una enzima con actividad óxido reductasa que es responsable de la biosíntesis de carnitina, compuesto esencial del metabolismo de los ácidos grasos (Vaz and Wanders, 2002). En humanos esta enzima ha sido detectada en riñón, hígado y cerebro (Rigault et

al., 2006). BBOX1 es una diana terapéutica que es inhibida con Mildronato, un medicamento clínicamente usado como cardioprotector (Liepinsh et al., 2006). Se ha sugerido que el uso terapéutico de este medicamento mejora el flujo sanguíneo restringido en regiones isquémicas durante un problema vascular cerebral isquémico crónico o agudo. Otros estudios muestran que el Mildronato puede ser beneficioso para el tratamiento de ataques epilépticos (Zvejniece et al., 2010).

SLC25A37 se expresa en el sistema nervioso central (Haitina et al., 2006), es responsable del transporte del hierro a través de la membrana mitocondrial (Paradkar et al., 2009), y se ha descrito que sus niveles están elevados en un modelo *in vitro* de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Hadzhieva et al., 2013).

C3 es el factor central en la cascada del complemento ya que todas las vías de activación del sistema del complemento conducen a la rotura de esta proteína (van Beek et al., 2003), paso crucial para el desarrollo de las respuestas de anafilotaxis, quimiotaxis, y fagocitosis (Daha, 2010). C3a está involucrado en inflamación y C3b es un opsonizador implicado en fagocitosis (Morgan et al., 1997b). En el cerebro, la activación del sistema del complemento juega un importante papel en la protección frente al daño por infección, trauma e isquemia. Sin embargo, una activación descontrolada de C3 en el cerebro conduce a inflamación y muerte neuronal (Ramaglia et al., 2008, Stephan et al., 2012).

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio del componente 3 del complemento (C3), ya que su expresión está fuertemente inducida por *C/EBP $\beta$*  y juega un papel central en procesos inflamatorios, en los que *C/EBP $\beta$*  está también implicada.

### ***Regulación de la expresión del gen de C3 por C/EBP $\beta$ en cultivos primarios de células gliales***

Nuestros resultados muestran claramente que diversos estímulos, como son el LPS y el glutamato, son capaces de inducir la expresión de *C/EBP $\beta$*  y C3 tanto en astrocitos y microglía de rata como en astrocitos de ratón. Estos datos indican una clara relación entre *C/EBP $\beta$*  y C3 y procesos inflamatorios, excitotóxicos y muerte celular que se producen en el SNC. Lo que es más importante, en este trabajo mostramos que la sobreexpresión de *C/EBP $\beta$*  en astrocitos de ratón mediante estudios de transfección con el vector pcDNA3 $\beta$ , induce la expresión del gen endógeno de C3. Por el contrario, el bloqueo de la expresión de *C/EBP $\beta$*  por interferencia con shRNA *C/EBP $\beta$*  reprime la expresión de este componente del complemento. Estos resultados sugieren que el efecto de LPS y glutamato sobre la

expresión de C3 podría estar mediado por C/EBP $\beta$ , la cual regularía los niveles de C3 tras el daño neural

Datos anteriores de nuestro grupo y de otros laboratorios han mostrado que el LPS regula la expresión de C/EBP $\beta$  en células gliales. El tratamiento con LPS induce un claro aumento de la expresión de C/EBP $\beta$  en cultivos primarios de astrocitos y microglía de ratón (Cortes-Canteli et al., 2008, Ejarque-Ortiz et al., 2007) y en cultivos primarios mixtos glía/neurona de rata (Perez-Capote et al., 2006). Hajishengalis y Lambris han sugerido que el aumento en los niveles de C/EBP $\beta$  tras el tratamiento con LPS está mediada por la activación de receptores tipo Toll (TLR) (Hajishengallis and Lambris, 2011).

Los TLR son receptores que tienen un papel central en la detección de patógenos y en la iniciación de la respuesta inflamatoria. En mamíferos se han identificado 13 genes que codifican TLRs que confieren al sistema inmune la capacidad de detectar múltiples agentes infecciosos (Jack et al., 2005). La microglía expresa al menos 9 de estos receptores, TLR 1 a 9 (Suzumura, 2009) y los astrocitos expresan principalmente TLR3 y bajos niveles del resto de TLRs (Jack et al., 2005). El LPS activa principalmente TLR4 que a su vez activa diferentes factores de transcripción pro-inflamatorios como NF- $\kappa$ B que se translocan al núcleo donde inducen la expresión de otros genes implicados en procesos inflamatorios, entre los cuales se encuentra C/EBP $\beta$ , que a su vez induce la expresión de genes implicados en la cascada inflamatoria (Fujihara et al., 2003, Hajishengallis and Lambris, 2011, Roos and Nord, 2012). La inducción paralela en la expresión de C/EBP $\beta$  y C3 después de la estimulación de células gliales por LPS, junto con los datos previos de regulación de los niveles de C3 por C/EBP $\beta$ , sugiere que la inducción de C3 por LPS se produce a través del aumento en la expresión de C/EBP $\beta$  después del tratamiento con LPS. Esta hipótesis concuerda con estudios previos. Maranto y col. observaron un aumento de la concentración de mRNA de C/EBP $\beta$  y C3 tras el tratamiento con IL-1 $\beta$  en astrocitos humanos (Maranto et al., 2008, Maranto et al., 2011). Cardinaux y col. mostraron en astrocitos de ratón tratados con LPS un aumento de los niveles de mRNA de C/EBP $\beta$  que precede al aumento de los niveles de mRNA de C3 (Cardinaux et al., 2000).

Respecto a C3, diversos autores han observado que tras el tratamiento con LPS se produce un incremento de la expresión de este gen en cultivos primarios de astrocitos y microglía de ratón (Cardinaux et al., 2000, Haga et al., 1993, Haga et al., 1996) y en astrocitos de rata (Rus et al., 1992). En este sentido, se ha descrito que el LPS además de activar receptores TLR, es capaz de activar la vía alternativa del complemento (Ricklin et al., 2010). Por

tanto el aumento en los niveles de C3 después del tratamiento de células gliales con LPS, podría deberse tanto a un efecto de C/EBP $\beta$  sobre C3 como a un efecto directo del LPS sobre el sistema del complemento.

Por otra parte, datos previos de nuestro laboratorio muestran un incremento de C/EBP $\beta$  en cultivos primarios de astrocitos de ratón tratados con glutamato (Cortes-Canteli et al., 2008), también observado por otros investigadores en cultivos mixtos de glía/neuronas de rata (Perez-Capote et al., 2006). En este trabajo demostramos también que el tratamiento de astrocitos primarios con glutamato induce un aumento en los niveles de C3. Se sabe desde hace mucho que una excesiva activación de los receptores de glutamato induce muerte neuronal en diferentes zonas del cerebro mediante un mecanismo de excitotoxicidad (Mahy et al., 1995, Nitsch and Scotti, 1992, Robledo et al., 1999). Por otro lado, aunque menos conocido, se ha sugerido que la sobreactivación de receptores de glutamato hace más sensibles a neuronas corticales de los efectos deletéreos del sistema del complemento, con lo cual se produce una masiva muerte neuronal. Los componentes del sistema del complemento causantes de esta citotoxicidad es el “complejo de ataque a la membrana” (MAC) (Xiong and McNamara, 2002). Nuestros resultados son coherentes con los estudios de Xiong y col., y sugieren que C3 podría ser un mediador de los efectos deletéreos de C/EBP $\beta$  bajo condiciones de excitotoxicidad en el cerebro.

En conjunto, todos estos resultados parecen indicar que C/EBP $\beta$  regula la expresión de C3 *in vitro* en respuesta a diversos estímulos y estarían claramente de acuerdo con los resultados de microarrays que muestran una reducción de la expresión de C3 en ratones carentes de C/EBP $\beta$  en comparación con ratones que expresan dicha proteína.

### ***Efectos anti-inflamatorios de la inhibición de la expresión de C/EBP $\beta$ y C3 in vitro***

En los procesos inflamatorios que se producen en el SNC se liberan citoquinas que son proteínas producidas fundamentalmente por células gliales. En un primer momento juegan un papel esencial en los mecanismos de defensa del cerebro frente a infecciones, inflamación, traumatismo e isquemias que inducen muerte neuronal.

Sin embargo, cuando la activación glial se mantiene en el tiempo, tanto astrocitos como microglía producen diferentes agentes proinflamatorios como IL-1 $\beta$  y COX-2, que actúan directamente sobre las neuronas, induciendo una mayor degeneración neuronal (McCoy and Tansey, 2008, Simi et al., 2007). La regulación de estos mediadores proinflamatorios

está considerada como un punto clave en el control del mecanismo de muerte neuronal (Allan and Rothwell, 2001).

Muchos de estos genes pro-inflamatorios presentan en sus regiones promotoras sitios consenso de unión para C/EBP $\beta$ , entre ellos IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-12 y el factor de necrosis tumoral (Akira et al., 1990, Pope et al., 1994, Matsusaka et al., 1993). En algunos de estos genes se ha demostrado que efectivamente C/EBP $\beta$  regula directamente su expresión.

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que C/EBP $\beta$  juega un papel fundamental en la inducción de genes proinflamatorios ya que cultivos primarios de neuronas y microglía de ratones KO para C/EBP $\beta$  presentaban una menor inducción de los genes IL-1 $\beta$  y COX-2 después del tratamiento con LPS (Cortes-Canteli et al., 2008). En el presente estudio ampliamos estos resultados, ya que observamos que tras el tratamiento con LPS los niveles de IL-1 $\beta$  y COX-2 aumentan drásticamente, junto con C/EBP $\beta$ , también en cultivos primarios de astrocitos de ratón. Y lo que es más importante, cuando inhibimos el aumento de expresión de C/EBP $\beta$  inducido por LPS mediante shRNA C/EBP $\beta$ , observamos una disminución en la expresión de los mediadores proinflamatorios IL-1 $\beta$  y COX-2, lo que sugiere claramente que C/EBP $\beta$  juega un papel fundamental en la regulación de estos genes. Nuestros resultados concuerdan con datos previos, comentados anteriormente, que muestran la presencia de sitios consenso de unión para C/EBP $\beta$  en el promotor de los genes de IL-1 $\beta$  y COX-2 (Wadleigh et al., 2000, Yang et al., 2000, Wu et al., 2005), lo que sugiere una regulación directa de ambos genes por C/EBP $\beta$ .

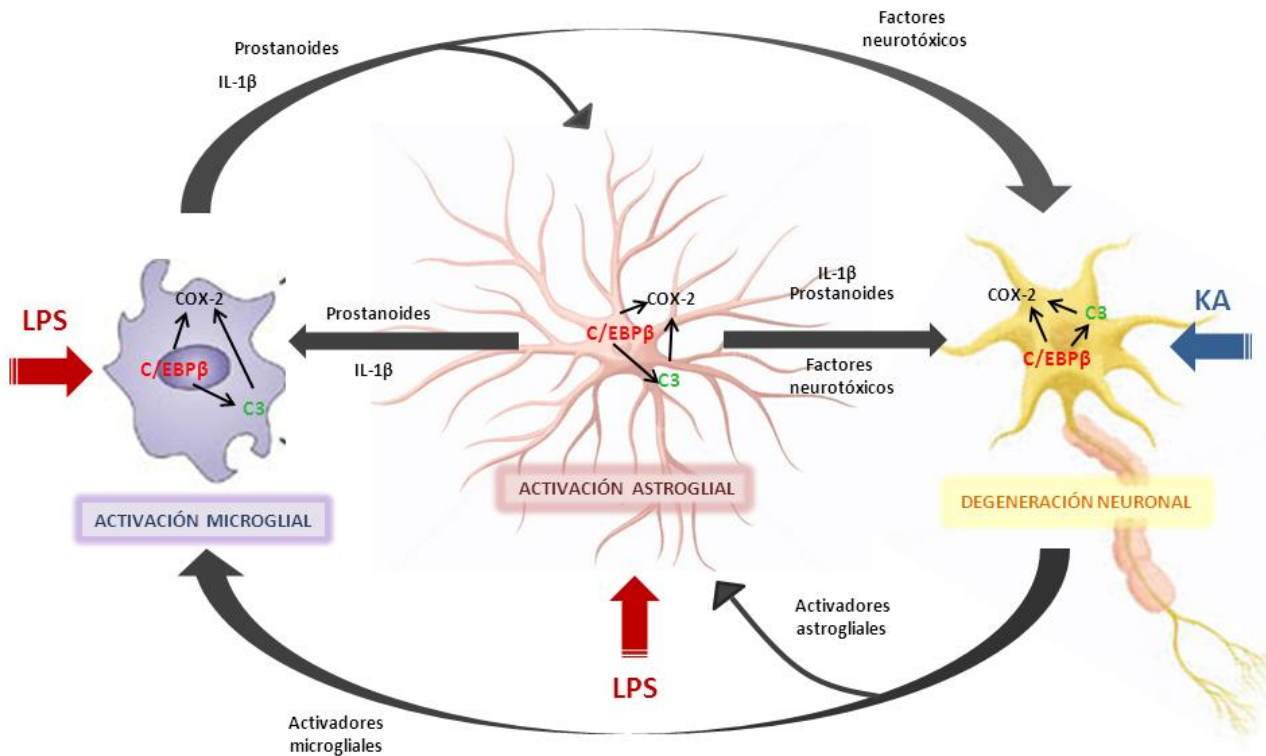
En este trabajo además hemos observado que siRNAs específicos de C3 inhiben la inducción de la expresión de esta proteína en astrocitos de ratón tras el tratamiento con LPS, lo cual se traduce en una disminución en los niveles de IL-1 $\beta$ , COX-2 y en la producción de nitritos. Estos resultados sugieren que C3 podría tener también un papel importante en la inducción de genes proinflamatorios en el cerebro. Un aumento de C3a, consecuencia de un aumento de C3, podría ser el responsable de la inducción de estos genes. C3a promueve el reclutamiento de células inmunes en la zona de inflamación e induce la liberación de citoquinas y agentes proinflamatorios como especies reactivas de oxígeno (ROS), IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-17 e INF- $\gamma$  (Gutzmer et al., 2006) además de activar células gliales (Nataf et al., 1999, Takabayashi et al., 2004, Liu et al., 2008). En este sentido, se ha descrito que en la mayoría de las enfermedades del SNC que están acompañadas de expresión de citoquinas, las anafilotoxinas del complemento juegan un



importante papel en el desarrollo de la neuroinflamación (Jauneau et al., 2003, Lucas et al., 2006, Rock and Peterson, 2006).

La importancia de IL-1 $\beta$  y COX-2 en procesos de daño cerebral se conoce desde hace tiempo por multitud de estudios que los implican en procesos inflamatorios, neurodegenerativos y de daño neural. IL-1 $\beta$  es una de las citoquinas que inician la respuesta inflamatoria y su inactivación génica tiene un claro efecto neuroprotector (Schielke et al., 1998, Dinarello, 2009, Medel-Matus et al., 2013, Rothwell and Luheshi, 2000, Simi et al., 2007). Se ha observado un incremento de IL-1 $\beta$  en diversos tipos de daño cerebral, incluyendo daño excitotóxico (Andrzejczak, 2011). También se ha descrito que IL-1 $\beta$  contribuye a la aparición de ataques epilépticos (Vezzani et al., 2008) y que su inhibición reduce dichos ataques (Maroso et al., 2011). COX-2 es la enzima que cataliza la conversión de ácido araquidónico en prostanoïdes, importantes reguladores de la respuesta inflamatoria inmune. COX-2 aumenta rápidamente en la zona de inflamación (O'Banion, 1999). Diversos estudios han mostrado que esta enzima se induce en procesos de daño cerebral asociado con procesos inflamatorios (Teismann et al., 2003, Adams et al., 1996, Breder and Saper, 1996, Ho et al., 1999, Oka and Takashima, 1997, Tocco et al., 1997), (Serrano et al., 2011, Nogawa et al., 1997, Strauss et al., 2000). El bloqueo o la inactivación génica de esta enzima atenúa la inflamación y por tanto el daño cerebral derivado de éste proceso (Nakayama et al., 1998, Ma et al., 2007).

En conjunto, los resultados presentados sugieren que el factor de transcripción C/EBP $\beta$  induce la expresión de los genes proinflamatorios COX-2 e IL-1 $\beta$  a través de dos vías: directamente por la unión a los promotores de estos genes (Wadleigh et al., 2000, Wu et al., 2005, Yang et al., 2000), y a través de la inducción de la expresión de C3 (**Figura A**). Nuestros resultados indican que la inhibición de C/EBP $\beta$  y C3 sería neuroprotectora, ya que bloquea la producción de agentes proinflamatorios perjudiciales para las neuronas. Esta hipótesis es coherente con estudios previos de nuestro laboratorio que muestran que la ausencia C/EBP $\beta$  es neuroprotectora frente al daño inducido por AK (Cortes-Canteli et al., 2008).



**Figura A. Neuroinflamación, neurodegeneración y gliosis reactiva.** Modificado de (Saijo et al., 2009) (LPS: lipopolisacárido. AK: ácido kaínico. C3: componente 3 del complemento. IL-1β: interleuquina 1β. COX-2: Ciclooxygenasa 2.

### ***C/EBPβ regula directamente C3 a través de la unión a su promotor***

El análisis *in silico* del promotor de C3 de ratón muestra que existen dos posibles sitios de unión del factor de transcripción C/EBPβ en las posiciones -616/-599 (sitio A) y -108/-94 (sitio B). Nuestros estudios de transfección transitoria demuestran que C/EBPβ induce de forma significativa la actividad del promotor de C3 de ratón, y que el sitio A es el más importante en esta acción. Así, la delección del promotor hasta la posición -255, donde eliminamos el sitio 5' de unión a C/EBPβ, y la mutación de este sitio A reduce drásticamente la activación por C/EBPβ de dicho promotor. La mutación del sitio B no tuvo un efecto significativo sobre la inducción de este promotor por C/EBPβ. Sin embargo, para lograr una completa anulación de la activación del promotor de C3 por este factor de transcripción es necesaria la delección hasta la posición -79, que elimina ambos sitios de unión. Por tanto, es probable que existan otras secuencias capaces de mediar la acción de C/EBPβ en el fragmento deleccionado, que no eliminamos con la mutación, pero sí con la

delección. En este sentido es interesante destacar la presencia de sitios consenso para los factores de transcripción AP-1 y CREB en las posiciones -165/-153 y -450/-430 respectivamente, ya que se ha descrito que C/EBP $\beta$  podría unirse como homodímero o formando heterodímeros con estas proteínas, modificando así su capacidad de transactivación y por tanto regulando de esta manera la expresión génica (Flammer et al., 2006, Hsu et al., 1994). Es interesante mencionar que también se han descrito dos sitios de unión a factores de transcripción de la familia C/EBP en el promotor humano de C3, en las posiciones -123/-115 y -110/-102 y que las isoformas LAP-1 y LAP-2 de C/EBP $\beta$  inducen dicho promotor, pero no la isoforma LIP que es inactiva (Maranto et al., 2008).

El promotor de C3 puede ser regulado, además de por C/EBP $\beta$ , por otros factores de transcripción, como C/EBP $\delta$ , otro miembro de la familia C/EBP que se expresa en el sistema nervioso central (Juan et al., 1993, Bruder et al., 2004), y también por NF- $\kappa$ B que regula dicho promotor en células epiteliales (Andoh et al., 2000). En este sentido, se sabe que la expresión de C/EBP $\delta$  durante la diferenciación de adipocitos se induce por C/EBP $\beta$ , lo cual sugiere que en la inducción de la expresión de C3 podría también estar implicado este otro miembro de la familia C/EBP, bien directamente o bien a través de su heterodimerización con C/EBP $\beta$ . Sin embargo son necesarios más estudios para analizar el posible papel de C/EBP $\delta$  en la regulación del promotor de C3 por C/EBP $\beta$ .

### ***Inducción de la expresión de C/EBP $\beta$ y C3 en un modelo de daño excitotóxico in vivo.***

La elección de la inyección de AK como modelo de excitotoxicidad para los estudios *in vivo* sobre la implicación de C/EBP $\beta$  y el posible papel mediador de C3 en este proceso, se deriva de los datos previos de nuestro laboratorio mostrando un importante papel de C/EBP $\beta$  en excitotoxicidad. Estos resultados previos muestran que la inyección de AK en esta zona del cerebro induce la expresión de C/EBP $\beta$ , la cual va acompañada de una importante pérdida neuronal en las zonas CA1 y CA3 del hipocampo y que ratones KO para C/EBP $\beta$  presentan una significativa disminución de muerte neuronal en dichas regiones, así como una menor activación glial y una reducción significativa de agentes proinflamatorios como COX-2 e IL-1 $\beta$  (Cortes-Canteli et al., 2008).

Los resultados del presente trabajo muestran que la inyección de AK directamente en el hipocampo de rata y ratón induce de manera significativa la expresión tanto de C/EBP $\beta$  como de C3. Un hecho interesante a destacar es que dicha inducción es paralela y ocurre en las mismas células. Nuestros resultados muestran que la inyección con AK produce un

aumento de C/EBP $\beta$  en las capas CA1 y CA3 no descritas previamente en nuestro laboratorio. El hecho de que en el trabajo mencionado anteriormente no se describiera la inducción de C/EBP $\beta$  en las zonas CA1 y CA3 se debe posiblemente a la diferente metodología empleada que permiten una mejor detección de C/EBP $\beta$  en otras zonas del hipocampo.

De igual manera a lo que hemos descrito *in vitro* en cultivos celulares, hemos comprobado la regulación directa de C3 por C/EBP $\beta$  *in vivo*, al mostrar que ratones carentes de C/EBP $\beta$  no presentan inducción de la expresión de C3 en hipocampo tras la inyección con AK. Estos datos en conjunto sugieren que C/EBP $\beta$  regula C3 *in vivo* durante el desarrollo de procesos excitotóxicos.

La importancia de estos resultados la pone de manifiesto el hecho de que la excitotoxicidad se ha implicado en múltiples procesos patológicos del sistema nervioso central como son daño isquémico, daño cerebral por trauma (Friberg and Wieloch, 2002, Mody and MacDonald, 1995, Norenberg and Rao, 2007, Starkov et al., 2004), enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington (Bezprozvanny, 2009, Choi, 1988, Doble, 1999, Gibson et al., 2010, Meldrum and Garthwaite, 1990, Wang et al., 2005) y epilepsia (DeLorenzo et al., 1998, Pal et al., 1999, Sombati and Delorenzo, 1995, Sun et al., 2002a). La administración de AK a animales de experimentación es un modelo clásico de epilepsia del lóbulo temporal en humano ya que produce daños en el hipocampo similares a los observados en humanos. En este sentido es interesante destacar que diversos autores han sugerido que el sistema del complemento juega un importante papel en procesos epilépticos (Xiong et al., 2003, Whitney and McNamara, 2000). Específicamente se ha observado un incremento de la expresión de C3 en cerebro de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal que es la forma de epilepsia más frecuente caracterizada por muerte neuronal y gliosis en el hipocampo (Jamali et al., 2006). Se han descrito también polimorfismos en el promotor de C3 que están involucrados en la susceptibilidad génica a los ataques epilépticos (Jamali et al., 2010), y se ha observado un aumento de los niveles de C3 en cerebro en un modelo murino de epilepsia por inyección de pilocarpina, estando dicho incremento directamente relacionado con la severidad de la condición epiléptica (Kharatishvili et al., 2013). Estos datos son coherentes con nuestros resultados que sugieren una posible implicación de C3 en procesos excitotóxicos en el hipocampo. Por tanto, C/EBP $\beta$  y C3 podrían ser candidatos para el desarrollo de nuevas terapias en

procesos epilépticos donde la terapia convencional no es capaz de detener o ralentizar el desarrollo de epileptogénesis.

La inyección de AK provoca la rotura de la barrera hematoencefálica en estadios tempranos, permitiendo la entrada de proteínas plasmáticas en el cerebro. Por ello, es posible que el aumento de proteína C3 observada en el hipocampo 72 horas después de la inyección de AK sea debido a las proteínas que atraviesan la barrera hematoencefálica, y no a la síntesis local de C3. Por ello hemos analizado los tipos celulares donde se produce el aumento de este componente del complemento, centrándonos fundamentalmente en tratar de correlacionarlo con el aumento observado de C/EBP $\beta$ . Es importante mencionar que nuestros resultados indican que el aumento de C3 tras la inyección de AK *in vivo* es debido, al menos en parte, a un aumento de la producción local ya que observamos un acúmulo de C3 en el citoplasma en células gliales y neuronas del hipocampo.

También mostramos que 72h después de la inyección de AK C3 se acumula en zonas vascularizadas y próximas a células de microglía que presentan un fenotipo ameboides fagocítico, típico de microglía activada. Estos resultados sugieren por un lado que la inducción de C3 podría participar en el desarrollo de vasos sanguíneos lo que estaría de acuerdo con datos de otros laboratorios que han observado que el complemento tiene funciones angiogénicas (Rohrer et al., 2009). Por otro lado, el acúmulo de C3 próximo a la microglía podría indicar que esta proteína ha sido secretada por dichas células, y estaría opsonizando restos celulares generados durante el proceso de daño neuronal para su posterior fagocitación (Mevorach et al., 1998). Sin embargo, no hemos podido detectar la presencia de C3 en el interior de las células de microglía, por lo que no podemos asegurar con certeza que éstas sean capaces de producirlo. Por el contrario, otros autores sí muestran a tiempos más cortos (24hr), un aumento de C3 en el interior de las células de microglía tras la inyección con AK (Morita et al., 2006) tras un daño cerebral (Al Nimer et al., 2013) y en modelos de enfermedad de Alzheimer (Fan et al., 2007). Es posible por tanto que tras un daño C3 se acumule en el interior de células de microglía y que después de un tiempo sea secretada al exterior.

En el caso de la expresión de C3 por células astrogliales, nuestros resultados muestran que 72h después de la inyección de AK esta proteína se acumula en el interior de estas células, fundamentalmente en la región CA3 del hipocampo. Sin embargo, Morita y col no observaron un acúmulo de C3 en astrocitos a las 24 h de la inyección con AK (Morita et

al., 2006). Esto podría deberse a los diferentes tiempos en los que se realizaron los experimentos. Es posible que 24 h después de la lesión no se produzca un aumento de C3 en astrocitos y sí se observaría dicho aumento a tiempos más tardíos.

Con respecto a las neuronas, hemos encontrado que C3 se localiza también tanto en restos neuronales como en el interior de neuronas que aún sobreviven al daño. La presencia de C3 en el interior de las neuronas en la zona dañada podría contribuir a la degeneración de dichas células. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores que muestran que entre 3 y 7 días después de la administración de AK, muchas neuronas piramidales en degeneración de las regiones CA1 y CA3 concentran C3 en su interior (Morita et al., 2006). Otros autores han observado expresión de C3 en neuronas bajo condiciones de isquemia (Yang et al., 2013, Cowell et al., 2003, Czurko and Nishino, 1994), derrame cerebral (Arumugam et al., 2007), daño traumático (Al Nimer et al., 2013) y en la enfermedad de Alzheimer (Terai et al., 1997).

### *C/EBP $\beta$ y C3: elementos claves en procesos de muerte neuronal*

Como ya hemos comentado, los ratones KO para C/EBP $\beta$  son menos vulnerables a la acción excitotóxica de AK y presentan, en comparación con los animales controles, una menor activación glial y una reducción dramática de la muerte neuronal en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo (Cortes-Canteli et al., 2008). Los resultados presentados en este trabajo, refuerzan la hipótesis de que C/EBP $\beta$  juega un papel fundamental en daño cerebral, ya que mostramos que en el hipocampo de ratones carentes de C/EBP $\beta$  hay una mayor expresión de genes considerados neuroprotectores y una menor expresión de genes considerados nocivos para las células del sistema nervioso. En este segundo grupo se encuentra C3 el cual, según los resultados mostrados en este trabajo, podría estar mediando los efectos de C/EBP $\beta$  sobre muerte neuronal y activación glial tras un daño excitotóxico o inflamatorio.

De acuerdo con nuestros resultados, C/EBP $\beta$  y C3 contribuirían al aumento de la producción de agentes proinflamatorios como COX-2 e IL-1 $\beta$  que están implicados en degeneración neuronal y en el desarrollo de diferentes patologías asociadas a procesos excitotóxicos. El proceso neurodegenerativo en hipocampo es facilitado, como indicamos en la Introducción, en parte porque las neuronas son más vulnerables a la activación del complemento ya que éstas sintetizan menos inhibidores. Esto estaría de acuerdo con

nuestros resultados donde observamos una importante muerte neuronal en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo tras la inyección con AK y el subsecuente aumento en los niveles de C3. C3 también parece estar implicada en la opsonización de restos neuronales para su posterior eliminación, y en un aumento de permeabilidad vascular para permitir la llegada de más células gliales y proteínas de fase aguda, lo que contribuiría a exacerbar el proceso inflamatorio, la muerte neuronal y la progresión del daño cerebral.

Diversos trabajos han sugerido que C/EBP $\beta$  podría jugar un papel en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Krabbe y Huntington (Colangelo et al., 2002, Giri et al., 2002, Obrietan and Hoyt, 2004, Bonin et al., 2004). Colangelo y cols mostraron mediante estudios de microarrays que los niveles de expresión de C/EBP $\beta$  están elevados en muestras de cerebro de pacientes de Alzheimer, en comparación con individuos controles. Los niveles de proteína C/EBP $\beta$  están también elevados en el lóbulo frontal de pacientes con Alzheimer en comparación con ancianos sin demencia. Los resultados de este estudio muestran que C/EBP $\beta$  se localizaba en células de microglía y en los alrededores de las placas  $\beta$  amiloides (Strohmeyer et al., 2014). Niveles elevados de C/EBP $\beta$  se han encontrado también en modelos murinos de esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington (Valente et al., 2012) (Bonin et al., 2004) (Obrietan and Hoyt, 2004).

Con respecto a C3, también se le ha relacionado con la progresión de enfermedades neurodegenerativas, aunque su papel en éstas es controvertido. Por un lado hay estudios que sugieren que el sistema del complemento podría ser beneficioso durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer ya que contribuiría a la eliminación de los depósitos de proteína  $\beta$ -amiloide (Wyss-Coray et al., 2002, Maier et al., 2008). Otros estudios sin embargo indican que la activación del sistema del complemento o una desregulación de este sería nociva en diversas patologías del SNC como esclerosis múltiple, Alzheimer, Huntington y Parkinson (Veerhuis et al., 2011). En este sentido, se han encontrado niveles elevados de C3 en los cuerpos de Lewis de pacientes con Parkinson (Yamada et al. 1992). Niveles elevados de C3 se han detectado también en el fluido cerebroespinal de pacientes con esclerosis múltiple (Annunziata and Volpi, 1985) y en enfermedad de Alzheimer (Wang et al., 2011) (al igual que C/EBP $\beta$  alrededor de las placas  $\beta$ -amiloides (Zanjani et al., 2005)); y también se han observado niveles elevados de C3c y C3dg en pacientes con Parkinson (Goldknopf et al., 2006). C3 parece estar también implicada en el daño agudo y

hay estudios que lo implican en daño isquémico y traumático (Ten et al., 2005, Al Nimer et al., 2013, Cowell et al., 2003).

En resumen, los datos presentados muestran que tanto C/EBP $\beta$  como C3 se inducen en respuesta a estímulos excitotóxicos e inflamatorios y que ambas proteínas podrían estar implicadas en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y daño cerebral agudo. Nuestros datos sugieren también que el efecto de C/EBP $\beta$  sobre muerte neuronal y activación glial está mediada por su regulación de la expresión de diversos genes relacionados con estos procesos y en concreto, por su regulación directa de C3. Por tanto, tanto C/EBP $\beta$  como C3 podrían considerarse como nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de diversas patologías del cerebro donde la excitotoxicidad y la inflamación juegan un papel importante.





## Conclusiones



1. - Mediante análisis de microarrays hemos identificado una serie de genes regulados por C/EBP $\beta$  en el hipocampo de ratones adultos. La expresión de genes neuroprotectores, como DNAP y PENK1, está aumentada en ratones C/EBP $\beta^{-/-}$ . Por el contrario la expresión de genes implicados en procesos neurodegenerativos, inflamatorios o de daño cerebral como C3 y ALOX5 está aumentada en el hipocampo de ratones C/EBP $\beta^{+/+}$  por lo que podrían ser mediadores del efecto de C/EBP $\beta$  en estos procesos. Hemos profundizado en el estudio de uno de estos genes: C3.

2.- Estímulos que provocan daño como LPS o glutamato inducen paralelamente tanto C/EBP $\beta$  como C3 en cultivos primarios de astrocitos. En dichos cultivos la sobreexpresión de C/EBP $\beta$  induce la expresión del gen endógeno de C3, junto con los genes proinflamatorios IL-1 $\beta$  y COX-2 y su interferencia la disminuye.

3. Los resultados utilizando iRNA de C/EBP $\beta$  y C3 indican que ambos genes son factores importantes en procesos excitotóxicos e inflamatorios.

4. Un aumento en los niveles de C3 en el hipocampo después de un daño excitotóxico está asociado con una mayor muerte neuronal y una mayor activación glial.

5. El aumento en los niveles de C3 en el hipocampo después de un daño excitotóxico se produce en las mismas zonas y tipos celulares del hipocampo donde se detecta un aumento de C/EBP $\beta$ .

6. El aumento en la expresión de C3 en hipocampo después de la inyección de AK, no se detecta en animales KO para C/EBP $\beta$

7. C/EBP $\beta$  induce la expresión de C3 y regula directamente su promotor a través de un sitio consenso de unión a este factor de transcripción. También presenta varios sitios de unión a AP-1 y CREB a través de los cuales C/EBP $\beta$  podría regular también la expresión génica de C3.

8. Los resultados obtenidos por análisis de microarrays, junto con los estudios *in vitro* e *in vivo* mostrando una clara regulación de C3 por C/EBP $\beta$ , sugieren que C3 podría ser un

mediador de los efectos deletéreos de C/EBP $\beta$  en el daño excitotóxico e inflamatorio que subyace a diversos trastornos del sistema nervioso central, tanto enfermedades neurodegenerativas como en un daño agudo.



## **Bibliografía**



- ADAMS, J., COLLACO-MORAES, Y. & DE BELLEROCHE, J. 1996. Cyclooxygenase-2 induction in cerebral cortex: an intracellular response to synaptic excitation. *J Neurochem*, 66, 6-13.
- AGRE, P., JOHNSON, P. F. & MCKNIGHT, S. L. 1989. Cognate DNA binding specificity retained after leucine zipper exchange between GCN4 and C/EBP. *Science*, 246, 922-6.
- AGUILAR-MORANTE, D., CORTES-CANTELI, M., SANZ-SANCRISTOBAL, M., SANTOS, A. & PEREZ-CASTILLO, A. 2011. Decreased CCAAT/enhancer binding protein beta expression inhibits the growth of glioblastoma cells. *Neuroscience*, 176, 110-9.
- AIN, Q. U., GREIG, N. H., NAWAZ, M. S., RASHID, S. & KAMAL, M. A. 2013. Exploring N1-p-Fluorobenzyl-Cymserine as an Inhibitor of 5-Lipoxygenase as a Candidate for Type 2 Diabetes and Neurodegenerative Disorder Treatment. *CNS Neurol Disord Drug Targets*.
- AIYAZ, M., LUPTON, M. K., PROITSI, P., POWELL, J. F. & LOVESTONE, S. 2012. Complement activation as a biomarker for Alzheimer's disease. *Immunobiology*, 217, 204-15.
- AKIRA, S., ISSHIKI, H., SUGITA, T., TANABE, O., KINOSHITA, S., NISHIO, Y., NAKAJIMA, T., HIRANO, T. & KISHIMOTO, T. 1990. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J*, 9, 1897-906.
- AL-ADSANI, A., BURKE, Z. D., EBERHARD, D., LAWRENCE, K. L., SHEN, C. N., RUSTGI, A. K., SAKAUE, H., FARRANT, J. M. & TOSH, D. 2010. Dexamethasone treatment induces the reprogramming of pancreatic acinar cells to hepatocytes and ductal cells. *PLoS One*, 5, e13650.
- AL NIMER, F., LINDBLOM, R., STROM, M., GUERREIRO-CACAIS, A. O., PARSA, R., AEINEHBAND, S., MATHIESEN, T., LIDMAN, O. & PIEHL, F. 2013. Strain influences on inflammatory pathway activation, cell infiltration and complement cascade after traumatic brain injury in the rat. *Brain Behav Immun*, 27, 109-22.
- ALAM, T., AN, M. R. & PAPACONSTANTINOU, J. 1992. Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J Biol Chem*, 267, 5021-4.
- ALBERINI, C. M., GHIRARDI, M., METZ, R. & KANDEL, E. R. 1994. C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in Aplysia. *Cell*, 76, 1099-114.
- ALBERTINI, J. J., SUJKA, S. K., HELAL, M. A., SEIGNE, J. D. & LOCKHART, J. L. 1998. Adenocarcinoma in a continent colonic urinary reservoir. *Urology*, 51, 499-500.
- ALCALAY, R. N., GILADI, E., PICK, C. G. & GOZES, I. 2004. Intranasal administration of NAP, a neuroprotective peptide, decreases anxiety-like behavior in aging mice in the elevated plus maze. *Neurosci Lett*, 361, 128-31.
- ALLAN, S. M. & ROTHWELL, N. J. 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 2, 734-44.
- ANDOH, A., FUJIYAMA, Y., SHIMADA, M. & BAMBA, T. 2000. Modulation of complement component (C3 and factor B) biosynthesis by a histone deacetylase inhibitor in human intestinal epithelial cells. *Int J Mol Med*, 6, 51-4.
- ANDRZEJCZAK, D. 2011. [Epilepsy and pro-inflammatory cytokines. Immunomodulating properties of antiepileptic drugs]. *Neurol Neurochir Pol*, 45, 275-85.

- ANNUNZIATA, P. & VOLPI, N. 1985. High levels of C3c in the cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neurol Scand*, 72, 61-4.
- ANTONSON, P., STELLAN, B., YAMANAKA, R. & XANTHOPOULOS, K. G. 1996. A novel human CCAAT/enhancer binding protein gene, C/EBPepsilon, is expressed in cells of lymphoid and myeloid lineages and is localized on chromosome 14q11.2 close to the T-cell receptor alpha/delta locus. *Genomics*, 35, 30-8.
- ARAMBASIC, J., POZNANOVIC, G., IVANOVIC-MATIC, S., BOGOJEVIC, D., MIHAILOVIC, M., USKOKOVIC, A. & GRIGOROV, I. 2010. Association of the glucocorticoid receptor with STAT3, C/EBPbeta, and the hormone-responsive element within the rat haptoglobin gene promoter during the acute phase response. *IUBMB Life*, 62, 227-36.
- ARENSDORF, A. M. & RUTKOWSKI, D. T. 2013. Endoplasmic reticulum stress impairs IL-4/IL-13 signaling through C/EBPbeta-mediated transcriptional suppression. *J Cell Sci*, 126, 4026-36.
- ARONICA, E., BOER, K., VAN VLIET, E. A., REDEKER, S., BAAYEN, J. C., SPLIET, W. G., VAN RIJEN, P. C., TROOST, D., DA SILVA, F. H., WADMAN, W. J. & GORTER, J. A. 2007. Complement activation in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*, 26, 497-511.
- ARUMUGAM, T. V., TANG, S. C., LATHIA, J. D., CHENG, A., MUGHAL, M. R., CHIGURUPATI, S., MAGNUS, T., CHAN, S. L., JO, D. G., OUYANG, X., FAIRLIE, D. P., GRANGER, D. N., VORTMEYER, A., BASTA, M. & MATTSON, M. P. 2007. Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 14104-9.
- BARAK, Y., NELSON, M. C., ONG, E. S., JONES, Y. Z., RUIZ-LOZANO, P., CHIEN, K. R., KODER, A. & EVANS, R. M. 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, 4, 585-95.
- BARNUM, S. R., FEY, G. & TACK, B. F. 1990. Biosynthesis and genetics of C3. *Curr Top Microbiol Immunol*, 153, 23-43.
- BASAK, C., PATHAK, S. K., BHATTACHARYYA, A., MANDAL, D., PATHAK, S. & KUNDU, M. 2005. NF-kappaB- and C/EBPbeta-driven interleukin-1beta gene expression and PAK1-mediated caspase-1 activation play essential roles in interleukin-1beta release from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem*, 280, 4279-88.
- BASSAN, M., ZAMOSTIANO, R., DAVIDSON, A., PINHASOV, A., GILADI, E., PERL, O., BASSAN, H., BLAT, C., GIBNEY, G., GLAZNER, G., BRENNEMAN, D. E. & GOZES, I. 1999. Complete sequence of a novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *J Neurochem*, 72, 1283-93.
- BASSI, M. T., SPERANDEO, M. P., INCERTI, B., BULFONE, A., PEPE, A., SURACE, E. M., GATTUSO, C., DE GRANDI, A., BUONINCONTI, A., RIBONI, M., MANZONI, M., ANDRIA, G., BALLABIO, A., BORSANI, G. & SEBASTIO, G. 1999. SLC7A8, a gene mapping within the lysinuric protein intolerance critical region, encodes a new member of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *Genomics*, 62, 297-303.
- BEDNARCZYK, J. L. & CAPRA, J. D. 1988. Post-translational processing of the murine third component of complement. *Scand J Immunol*, 27, 83-95.
- BENI-ADANI, L., GOZES, I., COHEN, Y., ASSAF, Y., STEINGART, R. A., BRENNEMAN, D. E., EIZENBERG, O., TREMBOLVER, V. & SHOHAMI, E. 2001. A peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP)



- ameliorates injury response in closed head injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 296, 57-63.
- BENOIT, M. E. & TENNER, A. J. 2011. Complement protein C1q-mediated neuroprotection is correlated with regulation of neuronal gene and microRNA expression. *J Neurosci*, 31, 3459-69.
- BERBERICH-SIEBELT, F., BERBERICH, I., ANDRULIS, M., SANTNER-NANAN, B., JHA, M. K., KLEIN-HESSLING, S., SCHIMPL, A. & SERFLING, E. 2006. SUMOylation interferes with CCAAT/enhancer-binding protein beta-mediated c-myc repression, but not IL-4 activation in T cells. *J Immunol*, 176, 4843-51.
- BEZPROZVANNY, I. 2009. Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med*, 15, 89-100.
- BILKEI-GORZO, A., MICHEL, K., NOBLE, F., ROQUES, B. P. & ZIMMER, A. 2007. Preproenkephalin knockout mice show no depression-related phenotype. *Neuropsychopharmacology*, 32, 2330-7.
- BONIN, M., POTHS, S., OSAKA, H., WANG, Y. L., WADA, K. & RIESS, O. 2004. Microarray expression analysis of gad mice implicates involvement of Parkinson's disease associated UCH-L1 in multiple metabolic pathways. *Brain Res Mol Brain Res*, 126, 88-97.
- BRADLEY, M. N., ZHOU, L. & SMALE, S. T. 2003. C/EBPbeta regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Mol Cell Biol*, 23, 4841-58.
- BRAUN, D., KINNE, A., BRAUER, A. U., SAPIN, R., KLEIN, M. O., KOHRLE, J., WIRTH, E. K. & SCHWEIZER, U. 2011. Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse brain and in primary brain cells. *Glia*, 59, 463-71.
- BREDER, C. D. & SAPER, C. B. 1996. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res*, 713, 64-9.
- BRUDER, C., HAGLEITNER, M., DARLINGTON, G., MOHSENIPOUR, I., WURZNER, R., HOLLMULLER, I., STOIBER, H., LASS-FLORL, C., DIERICH, M. P. & SPETH, C. 2004. HIV-1 induces complement factor C3 synthesis in astrocytes and neurons by modulation of promoter activity. *Mol Immunol*, 40, 949-61.
- BUCK, M. & CHOJKIER, M. 2011. C/EBPbeta-Thr217 phosphorylation signaling contributes to the development of lung injury and fibrosis in mice. *PLoS One*, 6, e25497.
- BUCK, M., POLI, V., VAN DER GEER, P., CHOJKIER, M. & HUNTER, T. 1999. Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha. *Mol Cell*, 4, 1087-92.
- BURGESS-BEUSSE, B. L. & DARLINGTON, G. J. 1998. C/EBPalpha is critical for the neonatal acute-phase response to inflammation. *Mol Cell Biol*, 18, 7269-77.
- CAHOY, J. D., EMERY, B., KAUSHAL, A., FOO, L. C., ZAMANIAN, J. L., CHRISTOPHERSON, K. S., XING, Y., LUBISCHER, J. L., KRIEG, P. A., KRUPENKO, S. A., THOMPSON, W. J. & BARRES, B. A. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*, 28, 264-78.
- CAIVANO, M., GORGONI, B., COHEN, P. & POLI, V. 2001. The induction of cyclooxygenase-2 mRNA in macrophages is biphasic and requires both CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBP beta ) and C/EBP delta transcription factors. *J Biol Chem*, 276, 48693-701.

- CAO, Z., UMEK, R. M. & MCKNIGHT, S. L. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*, 5, 1538-52.
- CARDINAUX, J. R., ALLAMAN, I. & MAGISTRETTI, P. J. 2000. Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. *Glia*, 29, 91-7.
- CARDINAUX, J. R. & MAGISTRETTI, P. J. 1996. Vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, and noradrenaline induce the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-beta and C/EBP delta in mouse cortical astrocytes: involvement in cAMP-regulated glycogen metabolism. *J Neurosci*, 16, 919-29.
- CERVERA, A., PLANAS, A. M., JUSTICIA, C., URRÁ, X., JENSENIUS, J. C., TORRES, F., LOZANO, F. & CHAMORRO, A. 2010. Genetically-defined deficiency of mannose-binding lectin is associated with protection after experimental stroke in mice and outcome in human stroke. *PLoS One*, 5, e8433.
- CESENA, T. I., CARDINAUX, J. R., KWOK, R. & SCHWARTZ, J. 2007. CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBPbeta at lysine 39 modulates its ability to activate transcription. *J Biol Chem*, 282, 956-67.
- COLANGELO, V., SCHURR, J., BALL, M. J., PELAEZ, R. P., BAZAN, N. G. & LUKIW, W. J. 2002. Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *J Neurosci Res*, 70, 462-73.
- COOPER, C., HENDERSON, A., ARTANDI, S., AVITAH, N. & CALAME, K. 1995. Ig/EBP (C/EBP gamma) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators. *Nucleic Acids Res*, 23, 4371-7.
- CORTES-CANTELI, M., AGUILAR-MORANTE, D., SANZ-SANCRISTOBAL, M., MEGIAS, D., SANTOS, A. & PEREZ-CASTILLO, A. 2011. Role of C/EBPbeta transcription factor in adult hippocampal neurogenesis. *PLoS One*, 6, e24842.
- CORTES-CANTELI, M., LUNA-MEDINA, R., SANZ-SANCRISTOBAL, M., ALVAREZ-BARRIENTOS, A., SANTOS, A. & PEREZ-CASTILLO, A. 2008. CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. *J Cell Sci*, 121, 1224-34.
- CORTES-CANTELI, M., PIGNATELLI, M., SANTOS, A. & PEREZ-CASTILLO, A. 2002. CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 277, 5460-7.
- CORTES-CANTELI, M., WAGNER, M., ANSORGE, W. & PEREZ-CASTILLO, A. 2004. Microarray analysis supports a role for ccaat/enhancer-binding protein-beta in brain injury. *J Biol Chem*, 279, 14409-17.
- COWELL, R. M., PLANE, J. M. & SILVERSTEIN, F. S. 2003. Complement activation contributes to hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *J Neurosci*, 23, 9459-68.
- CRONIGER, C., LEAHY, P., RESHEF, L. & HANSON, R. W. 1998. C/EBP and the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription in the liver. *J Biol Chem*, 273, 31629-32.
- CRONIGER, C. M., MILLWARD, C., YANG, J., KAWAI, Y., ARINZE, I. J., LIU, S., HARADA-SHIBA, M., CHAKRAVARTY, K., FRIEDMAN, J. E., POLI, V. & HANSON, R. W. 2001. Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta have an attenuated response to cAMP and impaired carbohydrate metabolism. *J Biol Chem*, 276, 629-38.

- CZURKO, A. & NISHINO, H. 1994. Appearance of immunoglobulin G and complement factor C3 in the striatum after transient focal ischemia in the rat. *Neurosci Lett*, 166, 51-4.
- CHANO, F. & DESCOTEAUX, A. 2002. Modulation of lipopolysaccharide-induced NF-IL6 activation by protein kinase C- $\alpha$  in a mouse macrophage cell line. *Eur J Immunol*, 32, 2897-904.
- CHEN, A., MUZZIO, I. A., MALLERET, G., BARTSCH, D., VERBITSKY, M., PAVLIDIS, P., YONAN, A. L., VRONSKAYA, S., GRODY, M. B., CEPEDA, I., GILLIAM, T. C. & KANDEL, E. R. 2003. Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins. *Neuron*, 39, 655-69.
- CHOI, D. W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1, 623-34.
- CHUMAKOV, A. M., GRILLIER, I., CHUMAKOVA, E., CHIH, D., SLATER, J. & KOEFFLER, H. P. 1997. Cloning of the novel human myeloid-cell-specific C/EBP-epsilon transcription factor. *Mol Cell Biol*, 17, 1375-86.
- DAHA, M. R. 2010. Role of complement in innate immunity and infections. *Crit Rev Immunol*, 30, 47-52.
- DARLINGTON, G. J., ROSS, S. E. & MACDOUGALD, O. A. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 273, 30057-60.
- DE BRUIJN, M. H. & FEY, G. H. 1985. Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 708-12.
- DEITMER, J. W., BROER, A. & BROER, S. 2003. Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways. *J Neurochem*, 87, 127-35.
- DELORENZO, R. J., PAL, S. & SOMBATI, S. 1998. Prolonged activation of the N-methyl-D-aspartate receptor-Ca<sup>2+</sup> transduction pathway causes spontaneous recurrent epileptiform discharges in hippocampal neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14482-7.
- DENTESANO, G., STRACCIA, M., EJARQUE-ORTIZ, A., TUSELL, J. M., SERRATOSA, J., SAURA, J. & SOLA, C. 2012. Inhibition of CD200R1 expression by C/EBP beta in reactive microglial cells. *J Neuroinflammation*, 9, 165.
- DESCOMBES, P., CHOJKIER, M., LICHTSTEINER, S., FALVEY, E. & SCHIBLER, U. 1990. LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev*, 4, 1541-51.
- DESCOMBES, P. & SCHIBLER, U. 1991. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell*, 67, 569-79.
- DIEHL, A. M. 1998. Roles of CCAAT/enhancer-binding proteins in regulation of liver regenerative growth. *J Biol Chem*, 273, 30843-6.
- DINARELLO, C. A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, 27, 519-50.
- DLASKA, M. & WEISS, G. 1999. Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol*, 162, 6171-7.
- DOBLE, A. 1999. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther*, 81, 163-221.
- DOLMER, K. & SOTTRUP-JENSEN, L. 1993. Disulfide bridges in human complement component C3b. *FEBS Lett*, 315, 85-90.

- EJARQUE-ORTIZ, A., MEDINA, M. G., TUSELL, J. M., PEREZ-GONZALEZ, A. P., SERRATOSA, J. & SAURA, J. 2007. Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. *Glia*, 55, 178-88.
- FAN, R., DEFILIPPIS, K. & VAN NOSTRAND, W. E. 2007. Induction of complement proteins in a mouse model for cerebral microvascular A beta deposition. *J Neuroinflammation*, 4, 22.
- FENG, R., DESBORDES, S. C., XIE, H., TILLO, E. S., PIXLEY, F., STANLEY, E. R. & GRAF, T. 2008. PU.1 and C/EBPalpha/beta convert fibroblasts into macrophage-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 6057-62.
- FIELDS, J., GARDNER-MERCER, J., BORGMANN, K., CLARK, I. & GHORPADE, A. 2011. CCAAT/enhancer binding protein beta expression is increased in the brain during HIV-1-infection and contributes to regulation of astrocyte tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Neurochem*, 118, 93-104.
- FINEHOUT, E. J., FRANCK, Z. & LEE, K. H. 2005. Complement protein isoforms in CSF as possible biomarkers for neurodegenerative disease. *Dis Markers*, 21, 93-101.
- FLAMMER, J. R., POPOVA, K. N. & PFLUM, M. K. 2006. Cyclic AMP response element-binding protein (CREB) and CAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) bind chimeric DNA sites with high affinity. *Biochemistry*, 45, 9615-23.
- FLIERL, M. A., RITTIRSCH, D., HUBER-LANG, M. S. & STAHEL, P. F. 2013. Complement in human disease. *Clin Dev Immunol*, 2013, 920474.
- FONG, K. Y., BOTTO, M., WALPORT, M. J. & SO, A. K. 1990. Genomic organization of human complement component C3. *Genomics*, 7, 579-86.
- FOURGEAUD, L. & BOULANGER, L. M. 2007. Synapse remodeling, compliments of the complement system. *Cell*, 131, 1034-6.
- FRANCIS, K., VAN BEEK, J., CANOVA, C., NEAL, J. W. & GASQUE, P. 2003. Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement. *Expert Rev Mol Med*, 5, 1-19.
- FRANK, M. M. & FRIES, L. F. 1991. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*, 12, 322-6.
- FRIBERG, H. & WIELOCH, T. 2002. Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. *Biochimie*, 84, 241-50.
- FUENTEALBA, L., SCHWORER, C., SCHROERING, A., RAHMATULLAH, M. & CAREY, D. J. 2004. Heregulin and forskolin-induced cyclin D3 expression in Schwann cells: role of a CCAAT promoter element and CCAAT enhancer binding protein. *Glia*, 45, 238-48.
- FUJIHARA, M., MUROI, M., TANAMOTO, K., SUZUKI, T., AZUMA, H. & IKEDA, H. 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther*, 100, 171-94.
- GASQUE, P. 2004. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol*, 41, 1089-98.
- GASQUE, P., DEAN, Y. D., MCGREAL, E. P., VANBEEK, J. & MORGAN, B. P. 2000. Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology*, 49, 171-86.
- GASQUE, P., FONTAINE, M. & MORGAN, B. P. 1995. Complement expression in human brain. Biosynthesis of terminal pathway components and regulators in human glial cells and cell lines. *J Immunol*, 154, 4726-33.
- GASQUE, P., ISCHENKO, A., LEGOEDDEC, J., MAUGER, C., SCHOUFT, M. T. & FONTAINE, M. 1993. Expression of the complement classical pathway by human

- glioma in culture. A model for complement expression by nerve cells. *J Biol Chem*, 268, 25068-74.
- GAVRILYUK, V., KALININ, S., HILBUSH, B. S., MIDDLECAMP, A., MCGUIRE, S., PELLIGRINO, D., WEINBERG, G. & FEINSTEIN, D. L. 2005. Identification of complement 5a-like receptor (C5L2) from astrocytes: characterization of anti-inflammatory properties. *J Neurochem*, 92, 1140-9.
- GE, Q. F., WEI, E. Q., ZHANG, W. P., HU, X., HUANG, X. J., ZHANG, L., SONG, Y., MA, Z. Q., CHEN, Z. & LUO, J. H. 2006. Activation of 5-lipoxygenase after oxygen-glucose deprivation is partly mediated via NMDA receptor in rat cortical neurons. *J Neurochem*, 97, 992-1004.
- GIBSON, G. E., STARKOV, A., BLASS, J. P., RATAN, R. R. & BEAL, M. F. 2010. Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1802, 122-34.
- GIRI, S., JATANA, M., RATTAN, R., WON, J. S., SINGH, I. & SINGH, A. K. 2002. Galactosylsphingosine (psychosine)-induced expression of cytokine-mediated inducible nitric oxide synthases via AP-1 and C/EBP: implications for Krabbe disease. *FASEB J*, 16, 661-72.
- GOLDKNOPF, I. L., SHETA, E. A., BRYSON, J., FOLSOM, B., WILSON, C., DUTY, J., YEN, A. A. & APPEL, S. H. 2006. Complement C3c and related protein biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 342, 1034-9.
- GOZES, I., GILADI, E., PINHASOV, A., BARDEA, A. & BRENNEMAN, D. E. 2000. Activity-dependent neurotrophic factor: intranasal administration of femtomolar-acting peptides improve performance in a water maze. *J Pharmacol Exp Ther*, 293, 1091-8.
- GOZES, I., STEWART, A., MORIMOTO, B., FOX, A., SUTHERLAND, K. & SCHMECHE, D. 2009. Addressing Alzheimer's disease tangles: from NAP to AL-108. *Curr Alzheimer Res*, 6, 455-60.
- GOZES, I., ZALTZMAN, R., HAUSER, J., BRENNEMAN, D. E., SHOHAMI, E. & HILL, J. M. 2005. The expression of activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) is regulated by brain damage and treatment of mice with the ADNP derived peptide, NAP, reduces the severity of traumatic head injury. *Curr Alzheimer Res*, 2, 149-53.
- GRAEBER, M. B. 2010. Changing face of microglia. *Science*, 330, 783-8.
- GRAEBER, M. B. & STREIT, W. J. 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119, 89-105.
- GRAVES, B. J., JOHNSON, P. F. & MCKNIGHT, S. L. 1986. Homologous recognition of a promoter domain common to the MSV LTR and the HSV tk gene. *Cell*, 44, 565-76.
- GREENBAUM, L. E., LI, W., CRESSMAN, D. E., PENG, Y., CILIBERTO, G., POLI, V. & TAUB, R. 1998. CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest*, 102, 996-1007.
- GREGGIO, S., ROSA, R. M., DOLGANOV, A., DE OLIVEIRA, I. M., MENEGAT, F. D., HENRIQUES, J. A. & DACOSTA, J. C. 2009. NAP prevents hippocampal oxidative damage in neonatal rats subjected to hypoxia-induced seizures. *Neurobiol Dis*, 36, 435-44.
- GROS, P., MILDER, F. J. & JANSSEN, B. J. 2008. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol*, 8, 48-58.

- GUO, J., SUN, Z., XIAO, S., LIU, D., JIN, G., WANG, E. & ZHOU, J. 2009. Proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients. *Cell Res*, 19, 1401-3.
- GUTZMER, R., KOTHER, B., ZWIRNER, J., DIJKSTRA, D., PURWAR, R., WITTMANN, M. & WERFEL, T. 2006. Human plasmacytoid dendritic cells express receptors for anaphylatoxins C3a and C5a and are chemoattracted to C3a and C5a. *J Invest Dermatol*, 126, 2422-9.
- HADZHIEVA, M., KIRCHES, E., WILISCH-NEUMANN, A., PACHOW, D., WALLESCH, M., SCHOENFELD, P., PAEGE, I., VIELHABER, S., PETRI, S., KEILHOFF, G. & MAWRIN, C. 2013. Dysregulation of iron protein expression in the G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience*, 230, 94-101.
- HAGA, S., AIZAWA, T., ISHII, T. & IKEDA, K. 1996. Complement gene expression in mouse microglia and astrocytes in culture: comparisons with mouse peritoneal macrophages. *Neurosci Lett*, 216, 191-4.
- HAGA, S., IKEDA, K., SATO, M. & ISHII, T. 1993. Synthetic Alzheimer amyloid beta/A4 peptides enhance production of complement C3 component by cultured microglial cells. *Brain Res*, 601, 88-94.
- HAITINA, T., LINDBLOM, J., RENSTROM, T. & FREDRIKSSON, R. 2006. Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics*, 88, 779-90.
- HAJISHENGALLIS, G. & LAMBRIS, J. D. 2011. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 11, 187-200.
- HALLGREN, R., TARENT, A. & VENGE, P. 1982. Lactoferrin, lysozyme, and beta 2-microglobulin levels in cerebrospinal fluid: differential indices of CNS inflammation. *Inflammation*, 6, 291-304.
- HANSEN, N. E., KARLE, H., JENSEN, A. & BOCK, E. 1977. Lysozyme activity in cerebrospinal fluid. Studies in inflammatory and non-inflammatory CNS disorders. *Acta Neurol Scand*, 55, 418-24.
- HANSON, R. W. 1998. Biological role of the isoforms of C/EBP minireview series. *J Biol Chem*, 273, 28543.
- HASE, S., KIKUCHI, N., IKENAKA, T. & INOUE, K. 1985. Structures of sugar chains of the third component of human complement. *J Biochem*, 98, 863-74.
- HASHIMOTO, K. 2008. Microglial activation in schizophrenia and minocycline treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32, 1758-9; author reply 1760.
- HAYASHI, Y., HIRAI, H., KAMIO, N., YAO, H., YOSHIOKA, S., MIURA, Y., ASHIHARA, E., FUJIYAMA, Y., TENEN, D. G. & MAEKAWA, T. 2013. C/EBPbeta promotes BCR-ABL-mediated myeloid expansion and leukemic stem cell exhaustion. *Leukemia*, 27, 619-28.
- HIRANI, S., LAMBRIS, J. D. & MULLER-EBERHARD, H. J. 1986. Structural analysis of the asparagine-linked oligosaccharides of human complement component C3. *Biochem J*, 233, 613-6.
- HO, L., PIERONI, C., WINGER, D., PUROHIT, D. P., AISEN, P. S. & PASINETTI, G. M. 1999. Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 57, 295-303.
- HOSOKAWA, M., KLEGERIS, A., MAGUIRE, J. & MCGEER, P. L. 2003. Expression of complement messenger RNAs and proteins by human oligodendroglial cells. *Glia*, 42, 417-23.
- HOU, Y., XUE, P., BAI, Y., LIU, D., WOODS, C. G., YARBOROUGH, K., FU, J., ZHANG, Q., SUN, G., COLLINS, S., CHAN, J. Y., YAMAMOTO, M.,

- ANDERSEN, M. E. & PI, J. 2012. Nuclear factor erythroid-derived factor 2-related factor 2 regulates transcription of CCAAT/enhancer-binding protein beta during adipogenesis. *Free Radic Biol Med*, 52, 462-72.
- HSU, W., KERPPOLA, T. K., CHEN, P. L., CURRAN, T. & CHEN-KIANG, S. 1994. Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol Cell Biol*, 14, 268-76.
- HUMAYUN, S., GOHAR, M., VOLKENING, K., MOISSE, K., LEYSTRA-LANTZ, C., MEPHAM, J., MCLEAN, J. & STRONG, M. J. 2009. The complement factor C5a receptor is upregulated in NFL-/- mouse motor neurons. *J Neuroimmunol*, 210, 52-62.
- ISHIBASHI, J., FIRTINA, Z., RAJAKUMARI, S., WOOD, K. H., CONROE, H. M., STEGER, D. J. & SEALE, P. 2012. An Evi1-C/EBPbeta complex controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene expression to initiate white fat cell differentiation. *Mol Cell Biol*, 32, 2289-99.
- JACK, C. S., ARBOUR, N., MANUSOW, J., MONTGRAIN, V., BLAIN, M., MCCREA, E., SHAPIRO, A. & ANTEL, J. P. 2005. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol*, 175, 4320-30.
- JAKOBSEN, J. S., WAAGE, J., RAPIN, N., BISGAARD, H. C., LARSEN, F. S. & PORSE, B. T. 2013. Temporal mapping of CEBPA and CEBPB binding during liver regeneration reveals dynamic occupancy and specific regulatory codes for homeostatic and cell cycle gene batteries. *Genome Res*, 23, 592-603.
- JAMALI, S., BARTOLOMEI, F., ROBAGLIA-SCHLUPP, A., MASSACRIER, A., PERAGUT, J. C., REGIS, J., DUFOUR, H., RAVID, R., ROLL, P., PEREIRA, S., ROYER, B., ROECKEL-TREVISIOL, N., FONTAINE, M., GUYE, M., BOUCRAUT, J., CHAUVEL, P., CAU, P. & SZEPEKOWSKI, P. 2006. Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. *Brain*, 129, 625-41.
- JAMALI, S., SALZMANN, A., PERROUD, N., PONSOLE-LENFANT, M., CILLARIO, J., ROLL, P., ROECKEL-TREVISIOL, N., CRESPEL, A., BALZAR, J., SCHLACHTER, K., GRUBER-SEDLIMAYR, U., PATARAIA, E., BAUMGARTNER, C., ZIMPRICH, A., ZIMPRICH, F., MALAFOSSE, A. & SZEPEKOWSKI, P. 2010. Functional variant in complement C3 gene promoter and genetic susceptibility to temporal lobe epilepsy and febrile seizures. *PLoS One*, 5.
- JANA, M., ANDERSON, J. A., SAHA, R. N., LIU, X. & PAHAN, K. 2005. Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes. *Free Radic Biol Med*, 38, 655-64.
- JANSSEN, B. J., CHRISTODOULIDOU, A., MCCARTHY, A., LAMBRIS, J. D. & GROS, P. 2006. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature*, 444, 213-6.
- JAUNEAU, A. C., ISCHENKO, A., CHAN, P. & FONTAINE, M. 2003. Complement component anaphylatoxins upregulate chemokine expression by human astrocytes. *FEBS Lett*, 537, 17-22.
- JOHNSON, P. F. 1993. Identification of C/EBP basic region residues involved in DNA sequence recognition and half-site spacing preference. *Mol Cell Biol*, 13, 6919-30.
- JOHNSON, P. F. 2005. Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J Cell Sci*, 118, 2545-55.
- JUAN, T. S., WILSON, D. R., WILDE, M. D. & DARLINGTON, G. J. 1993. Participation of the transcription factor C/EBP delta in the acute-phase regulation

- of the human gene for complement component C3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2584-8.
- KAISHO, T., TSUTSUI, H., TANAKA, T., TSUJIMURA, T., TAKEDA, K., KAWAI, T., YOSHIDA, N., NAKANISHI, K. & AKIRA, S. 1999. Impairment of natural killer cytotoxic activity and interferon gamma production in CCAAT/enhancer binding protein gamma-deficient mice. *J Exp Med*, 190, 1573-82.
- KAPADIA, R., TUREYEN, K., BOWEN, K. K., KALLURI, H., JOHNSON, P. F. & VEMUGANTI, R. 2006. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem*, 98, 1718-31.
- KFOURY, N. & KAPATOS, G. 2009. Identification of neuronal target genes for CCAAT/enhancer binding proteins. *Mol Cell Neurosci*, 40, 313-27.
- KHARATISHVILI, I., SHAN, Z. Y., SHE, D. T., FOONG, S., KURNIAWAN, N. D. & REUTENS, D. C. 2013. MRI changes and complement activation correlate with epileptogenicity in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Brain Struct Funct*.
- KIM, H. G., YANG, J. H., HAN, E. H., CHOI, J. H., KHANAL, T., JEONG, M. H., JEONG, T. C. & JEONG, H. G. 2013. Inhibitory effect of dihydroartemisinin against phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Food Chem Toxicol*, 56, 93-9.
- KIM, J., CANTWELL, C. A., JOHNSON, P. F., PFARR, C. M. & WILLIAMS, S. C. 2002. Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J Biol Chem*, 277, 38037-44.
- KLOS, A., TENNER, A. J., JOHNSWICH, K. O., AGER, R. R., REIS, E. S. & KOHL, J. 2009. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol*, 46, 2753-66.
- KOCIEDA, V. P., ADHIKARY, S., EMIG, F., YEN, J. H., TOSCANO, M. G. & GANEA, D. 2012. Prostaglandin E2-induced IL-23p19 subunit is regulated by cAMP-responsive element-binding protein and C/EBP enhancer-binding protein beta in bone marrow-derived dendritic cells. *J Biol Chem*, 287, 36922-35.
- KOSSMANN, T., STAHEL, P. F., MORGANTI-KOSSMANN, M. C., JONES, J. L. & BARNUM, S. R. 1997. Elevated levels of the complement components C3 and factor B in ventricular cerebrospinal fluid of patients with traumatic brain injury. *J Neuroimmunol*, 73, 63-9.
- KOWENZ-LEUTZ, E., TWAMLEY, G., ANSIEAU, S. & LEUTZ, A. 1994. Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes Dev*, 8, 2781-91.
- LAMBRIS, J. D. 1988. The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol Today*, 9, 387-93.
- LANDSCHULZ, W. H., JOHNSON, P. F. & MCKNIGHT, S. L. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240, 1759-64.
- LANE, M. D., TANG, Q. Q. & JIANG, M. S. 1999. Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 266, 677-83.
- LAW, S. K. & DODDS, A. W. 1997. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci*, 6, 263-74.
- LE, W., ROWE, D., XIE, W., ORTIZ, I., HE, Y. & APPEL, S. H. 2001. Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease. *J Neurosci*, 21, 8447-55.



- LEBLHUBER, F., WALLI, J., JELLINGER, K., TILZ, G. P., WIDNER, B., LACCONE, F. & FUCHS, D. 1998. Activated immune system in patients with Huntington's disease. *Clin Chem Lab Med*, 36, 747-50.
- LECHNER, S., MITTERBERGER, M. C., MATTESICH, M. & ZWERSCHKE, W. 2013. Role of C/EBPbeta-LAP and C/EBPbeta-LIP in early adipogenic differentiation of human white adipose-derived progenitors and at later stages in immature adipocytes. *Differentiation*, 85, 20-31.
- LEKSTROM-HIMES, J. & XANTHOPOULOS, K. G. 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem*, 273, 28545-8.
- LEVI-STRAUSS, M. & MALLAT, M. 1987. Primary cultures of murine astrocytes produce C3 and factor B, two components of the alternative pathway of complement activation. *J Immunol*, 139, 2361-6.
- LI, X., MOLINA, H., HUANG, H., ZHANG, Y. Y., LIU, M., QIAN, S. W., SLAWSON, C., DIAS, W. B., PANDEY, A., HART, G. W., LANE, M. D. & TANG, Q. Q. 2009. O-linked N-acetylglucosamine modification on CCAAT enhancer-binding protein beta: role during adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 284, 19248-54.
- LIBBEY, J. E., KIRKMAN, N. J., WILCOX, K. S., WHITE, H. S. & FUJINAMI, R. S. 2010. Role for complement in the development of seizures following acute viral infection. *J Virol*, 84, 6452-60.
- LIEPINSH, E., VILSKERSTS, R., LOCA, D., KIRJANOVA, O., PUGOVICH, O., KALVINSH, I. & DAMBROVA, M. 2006. Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 48, 314-9.
- LISS, A., OOI, C. H., ZJABLOVSKAJA, P., BENOUKRAF, T., RADOMSKA, H. S., JU, C., WU, M., BALASTIK, M., DELWEL, R., BRDICKA, T., TAN, P., TENEN, D. G. & ALBERICH-JORDA, M. 2013. The gene signature in CCAAT-enhancer-binding protein alpha dysfunctional acute myeloid leukemia predicts responsiveness to histone deacetylase inhibitors. *Haematologica*.
- LIU, J., LIN, F., STRAINIC, M. G., AN, F., MILLER, R. H., ALTUNTAS, C. Z., HEEGER, P. S., TUOHY, V. K. & MEDOF, M. E. 2008. IFN-gamma and IL-17 production in experimental autoimmune encephalomyelitis depends on local APC-T cell complement production. *J Immunol*, 180, 5882-9.
- LIU, S., CRONIGER, C., ARIZMENDI, C., HARADA-SHIBA, M., REN, J., POLI, V., HANSON, R. W. & FRIEDMAN, J. E. 1999. Hypoglycemia and impaired hepatic glucose production in mice with a deletion of the C/EBPbeta gene. *J Clin Invest*, 103, 207-13.
- LOEFFLER, D. A., CAMP, D. M. & CONANT, S. B. 2006. Complement activation in the Parkinson's disease substantia nigra: an immunocytochemical study. *J Neuroinflammation*, 3, 29.
- LOPEZ, M. E., KLEIN, A. D. & SCOTT, M. P. 2012. Complement is dispensable for neurodegeneration in Niemann-Pick disease type C. *J Neuroinflammation*, 9, 216.
- LOWENSTEIN, C. J., ALLEY, E. W., RAVAL, P., SNOWMAN, A. M., SNYDER, S. H., RUSSELL, S. W. & MURPHY, W. J. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 9730-4.
- LUCAS, S. M., ROTHWELL, N. J. & GIBSON, R. M. 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S232-40.

- LUNA-MEDINA, R., CORTES-CANTELI, M., SANCHEZ-GALIANO, S., MORALES-GARCIA, J. A., MARTINEZ, A., SANTOS, A. & PEREZ-CASTILLO, A. 2007. NP031112, a thiadiazolidinone compound, prevents inflammation and neurodegeneration under excitotoxic conditions: potential therapeutic role in brain disorders. *J Neurosci*, 27, 5766-76.
- LYNCH, A. M., ECKEL, R. H., MURPHY, J. R., GIBBS, R. S., WEST, N. A., GICLAS, P. C., SALMON, J. E. & HOLERS, V. M. 2012. Prepregnancy obesity and complement system activation in early pregnancy and the subsequent development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 206, 428 e1-8.
- LYONS, L. C., COLLADO, M. S., KHABOUR, O., GREEN, C. L. & ESKIN, A. 2006. The circadian clock modulates core steps in long-term memory formation in Aplysia. *J Neurosci*, 26, 8662-71.
- MA, K., LANGENBACH, R., RAPOPORT, S. I. & BASSELIN, M. 2007. Altered brain lipid composition in cyclooxygenase-2 knockout mouse. *J Lipid Res*, 48, 848-54.
- MACKEY, S. L. & DARLINGTON, G. J. 2004. CCAAT enhancer-binding protein alpha is required for interleukin-6 receptor alpha signaling in newborn hepatocytes. *J Biol Chem*, 279, 16206-13.
- MAHY, N., BENDAHAN, G., BOATELL, M. L., BJELKE, B., TINNER, B., OLSON, L. & FUXE, K. 1995. Differential brain area vulnerability to long-term subcortical excitotoxic lesions. *Neuroscience*, 65, 15-25.
- MAIER, M., PENG, Y., JIANG, L., SEABROOK, T. J., CARROLL, M. C. & LEMERE, C. A. 2008. Complement C3 deficiency leads to accelerated amyloid beta plaque deposition and neurodegeneration and modulation of the microglia/macrophage phenotype in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci*, 28, 6333-41.
- MALLUCCI, G. R. 2009. Prion neurodegeneration: starts and stops at the synapse. *Prion*, 3, 195-201.
- MANEV, H., UZ, T. & QU, T. 2000. 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase mRNA expression in rat hippocampus: early response to glutamate receptor activation by kainate. *Exp Gerontol*, 35, 1201-9.
- MARANTO, J., RAPPAPORT, J. & DATTA, P. K. 2008. Regulation of complement component C3 in astrocytes by IL-1beta and morphine. *J Neuroimmune Pharmacol*, 3, 43-51.
- MARANTO, J., RAPPAPORT, J. & DATTA, P. K. 2011. Role of C/EBP-beta, p38 MAPK, and MKK6 in IL-1beta-mediated C3 gene regulation in astrocytes. *J Cell Biochem*, 112, 1168-75.
- MAROSO, M., BALOSSO, S., RAVIZZA, T., IORI, V., WRIGHT, C. I., FRENCH, J. & VEZZANI, A. 2011. Interleukin-1beta biosynthesis inhibition reduces acute seizures and drug resistant chronic epileptic activity in mice. *Neurotherapeutics*, 8, 304-15.
- MASTELLOS, D., GERMENIS, A. E. & LAMBRIS, J. D. 2005. Complement: an inflammatory pathway fulfilling multiple roles at the interface of innate immunity and development. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4, 125-7.
- MATSUSAKA, T., FUJIKAWA, K., NISHIO, Y., MUKAIDA, N., MATSUSHIMA, K., KISHIMOTO, T. & AKIRA, S. 1993. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10193-7.
- MCCOY, M. K. & TANSEY, M. G. 2008. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation*, 5, 45.

- MCGEER, P. L. & MCGEER, E. G. 2002a. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*, 26, 459-70.
- MCGEER, P. L. & MCGEER, E. G. 2002b. Innate immunity, local inflammation, and degenerative disease. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2002, re3.
- MCGEER, P. L. & MCGEER, E. G. 2002c. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *J Neurovirol*, 8, 529-38.
- MCGEER, P. L. & MCGEER, E. G. 2002d. The possible role of complement activation in Alzheimer disease. *Trends Mol Med*, 8, 519-23.
- MEDEL-MATUS, J. S., CORTIJO-PALACIOS, L. X., ALVAREZ-CRODA, D. M., MARTINEZ-QUIROZ, J. & LOPEZ-MERAZ, M. L. 2013. [Interleukin-1ss, seizures and neuronal cell death]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 30, 262-7.
- MELDRUM, B. & GARTHWAITE, J. 1990. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*, 11, 379-87.
- MENARD, C., HEIN, P., PAQUIN, A., SAVELSON, A., YANG, X. M., LEDERFEIN, D., BARNABE-HEIDER, F., MIR, A. A., STERNECK, E., PETERSON, A. C., JOHNSON, P. F., VINSON, C. & MILLER, F. D. 2002. An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. *Neuron*, 36, 597-610.
- MERHAV, M., KUULMANN-VANDER, S., ELKOBI, A., JACOBSON-PICK, S., KARNI, A. & ROSENBLUM, K. 2006. Behavioral interference and C/EBPbeta expression in the insular-cortex reveal a prolonged time period for taste memory consolidation. *Learn Mem*, 13, 571-4.
- METZ, R. & ZIFF, E. 1991. cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription. *Genes Dev*, 5, 1754-66.
- MEVORACH, D., MASCARENHAS, J. O., GERSHOV, D. & ELKON, K. B. 1998. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med*, 188, 2313-20.
- MEYER, U., FELDON, J. & DAMMANN, O. 2011. Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation? *Pediatr Res*, 69, 26R-33R.
- MISUMI, Y., ODA, K., FUJIWARA, T., TAKAMI, N., TASHIRO, K. & IKEHARA, Y. 1991. Functional expression of furin demonstrating its intracellular localization and endoprotease activity for processing of proalbumin and complement pro-C3. *J Biol Chem*, 266, 16954-9.
- MOCCO, J., MACK, W. J., DUCRUET, A. F., SOSUNOV, S. A., SUGHRUE, M. E., HASSID, B. G., NAIR, M. N., LAUFER, I., KOMOTAR, R. J., CLAIRE, M., HOLLAND, H., PINSKY, D. J. & CONNOLLY, E. S., JR. 2006a. Complement component C3 mediates inflammatory injury following focal cerebral ischemia. *Circ Res*, 99, 209-17.
- MOCCO, J., SUGHRUE, M. E., DUCRUET, A. F., KOMOTAR, R. J., SOSUNOV, S. A. & CONNOLLY, E. S., JR. 2006b. The complement system: a potential target for stroke therapy. *Adv Exp Med Biol*, 586, 189-201.
- MOCCO, J., WILSON, D. A., KOMOTAR, R. J., SUGHRUE, M. E., COATES, K., SACCO, R. L., ELKIND, M. S. & CONNOLLY, E. S., JR. 2006c. Alterations in plasma complement levels after human ischemic stroke. *Neurosurgery*, 59, 28-33; discussion 28-33.
- MODY, I. & MACDONALD, J. F. 1995. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Trends Pharmacol Sci*, 16, 356-9.

- MONJI, A., KATO, T. & KANBA, S. 2009. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*, 63, 257-65.
- MOORE, F., SANTIN, I., NOGUEIRA, T. C., GURZOV, E. N., MARSELLI, L., MARCHETTI, P. & EIZIRIK, D. L. 2012. The transcription factor C/EBP delta has anti-apoptotic and anti-inflammatory roles in pancreatic beta cells. *PLoS One*, 7, e31062.
- MORGAN, B. P., GASQUE, P., SINGHRAO, S. & PIDDLESSEN, S. J. 1997a. The role of complement in disorders of the nervous system. *Immunopharmacology*, 38, 43-50.
- MORGAN, B. P., GASQUE, P., SINGHRAO, S. K. & PIDDLESSEN, S. J. 1997b. Role of complement in inflammation and injury in the nervous system. *Exp Clin Immunogenet*, 14, 19-23.
- MORGAN, J. T., CHANA, G., PARDO, C. A., ACHIM, C., SEMENDEFERI, K., BUCKWALTER, J., COURCHESNE, E. & EVERALL, I. P. 2010. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol Psychiatry*, 68, 368-76.
- MORITA, H., SUZUKI, K., MORI, N. & YASUHARA, O. 2006. Occurrence of complement protein C3 in dying pyramidal neurons in rat hippocampus after systemic administration of kainic acid. *Neurosci Lett*, 409, 35-40.
- MORIYAMA, T., AMAMIYA, N., OCHI, A., TSURUTA, Y., SHIMIZU, A., KOJIMA, C., ITABASHI, M., TAKEI, T., UCHIDA, K. & NITTA, K. 2011. Long-term beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor blocker therapy for patients with advanced immunoglobulin A nephropathy and impaired renal function. *Clin Exp Nephrol*, 15, 700-7.
- MOROSSETTI, R., PARK, D. J., CHUMAKOV, A. M., GRILLIER, I., SHIOHARA, M., GOMBART, A. F., NAKAMAKI, T., WEINBERG, K. & KOEFFLER, H. P. 1997. A novel, myeloid transcription factor, C/EBP epsilon, is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. *Blood*, 90, 2591-600.
- MUKHERJEE, D., KAESTNER, K. H., KOVALOVICH, K. K. & GREENBAUM, L. E. 2001. Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes is dependent on C/EBPbeta. *Hepatology*, 33, 1166-72.
- MULLER-EBERHARD, H. J. & NILSSON, U. 1960. RELATION OF A beta(1)-GLYCOPROTEIN OF HUMAN SERUM TO THE COMPLEMENT SYSTEM. *J Exp Med*, 111, 217-34.
- MULLER, C., KOWENZ-LEUTZ, E., GRIESER-ADE, S., GRAF, T. & LEUTZ, A. 1995. NF-M (chicken C/EBP beta) induces eosinophilic differentiation and apoptosis in a hematopoietic progenitor cell line. *EMBO J*, 14, 6127-35.
- NADEAU, S., HEIN, P., FERNANDES, K. J., PETERSON, A. C. & MILLER, F. D. 2005. A transcriptional role for C/EBP beta in the neuronal response to axonal injury. *Mol Cell Neurosci*, 29, 525-35.
- NAKAYAMA, M., UCHIMURA, K., ZHU, R. L., NAGAYAMA, T., ROSE, M. E., STETLER, R. A., ISAKSON, P. C., CHEN, J. & GRAHAM, S. H. 1998. Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10954-9.
- NATAF, S., STAHEL, P. F., DAVOUST, N. & BARNUM, S. R. 1999. Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends Neurosci*, 22, 397-402.
- NATSUMA, S., AKIRA, S., NISHIO, Y., HASHIMOTO, S., SUGITA, T., ISSHIKI, H. & KISHIMOTO, T. 1992. Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6. *Blood*, 79, 460-6.

- NATSUUME-SAKAI, S., HAYAKAWA, J. I. & TAKAHASHI, M. 1978. Genetic polymorphism of murine C3 controlled by a single co-dominant locus on chromosome 17. *J Immunol*, 121, 491-8.
- NERLOV, C. 2008. C/EBPs: recipients of extracellular signals through proteome modulation. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 180-5.
- NISHIO, Y., ISSHIKI, H., KISHIMOTO, T. & AKIRA, S. 1993. A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction. *Mol Cell Biol*, 13, 1854-62.
- NITSCH, C. & SCOTTI, A. L. 1992. Ibotenic acid-induced calcium deposits in rat substantia nigra. Ultrastructure of their time-dependent formation. *Acta Neuropathol*, 85, 55-70.
- NODA, M., FURUTANI, Y., TAKAHASHI, H., TOYOSATO, M., HIROSE, T., INAYAMA, S., NAKANISHI, S. & NUMA, S. 1982. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature*, 295, 202-6.
- NOGAWA, S., ZHANG, F., ROSS, M. E. & IADECOLA, C. 1997. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci*, 17, 2746-55.
- NORDAHL, E. A., RYDENGARD, V., NYBERG, P., NITSCHKE, D. P., MORGELIN, M., MALMSTEN, M., BJORCK, L. & SCHMIDTCHEN, A. 2004. Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16879-84.
- NORENBERG, M. D. & RAO, K. V. 2007. The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. *Neurochem Int*, 50, 983-97.
- O'BANION, M. K. 1999. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol*, 13, 45-82.
- O'NEIL, K. T., HOESS, R. H. & DEGRADO, W. F. 1990. Design of DNA-binding peptides based on the leucine zipper motif. *Science*, 249, 774-8.
- O'SHEA, E. K., RUTKOWSKI, R. & KIM, P. S. 1989. Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science*, 243, 538-42.
- OBRIETAN, K. & HOYT, K. R. 2004. CRE-mediated transcription is increased in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurosci*, 24, 791-6.
- OH, H. J., LEE, H., PARK, J. W., RHEE, H., KOO, S. K., KANG, S., JO, I. & JUNG, S. C. 2005. Reversal of gene expression profile in the phenylketonuria mouse model after adeno-associated virus vector-mediated gene therapy. *Mol Genet Metab*, 86 Suppl 1, S124-32.
- OKA, A. & TAKASHIMA, S. 1997. Induction of cyclo-oxygenase 2 in brains of patients with Down's syndrome and dementia of Alzheimer type: specific localization in affected neurones and axons. *Neuroreport*, 8, 1161-4.
- ORELLANA, D., LIU, X., WANG, G. L., JIN, J., IAKOVA, P. & TIMCHENKO, N. A. 2010. Calmodulin controls liver proliferation via interactions with C/EBPbeta-LAP and C/EBPbeta-LIP. *J Biol Chem*, 285, 23444-56.
- OSADA, S., YAMAMOTO, H., NISHIHARA, T. & IMAGAWA, M. 1996. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem*, 271, 3891-6.
- PAL, S., SOMBATI, S., LIMBRICK, D. D., JR. & DELORENZO, R. J. 1999. In vitro status epilepticus causes sustained elevation of intracellular calcium levels in hippocampal neurons. *Brain Res*, 851, 20-31.

- PANGBURN, M. K., SCHREIBER, R. D. & MULLER-EBERHARD, H. J. 1983. C3b deposition during activation of the alternative complement pathway and the effect of deposition on the activating surface. *J Immunol*, 131, 1930-5.
- PAQUIN, A., BARNABE-HEIDER, F., KAGEYAMA, R. & MILLER, F. D. 2005. CCAAT/enhancer-binding protein phosphorylation biases cortical precursors to generate neurons rather than astrocytes in vivo. *J Neurosci*, 25, 10747-58.
- PARADKAR, P. N., ZUMBRENNEN, K. B., PAW, B. H., WARD, D. M. & KAPLAN, J. 2009. Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Mol Cell Biol*, 29, 1007-16.
- PARDO, C. A., VARGAS, D. L. & ZIMMERMAN, A. W. 2005. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *Int Rev Psychiatry*, 17, 485-95.
- PEREZ-CAPOTE, K., SAURA, J., SERRATOSA, J. & SOLA, C. 2006. Expression of C/EBPalpha and C/EBPbeta in glial cells in vitro after inducing glial activation by different stimuli. *Neurosci Lett*, 410, 25-30.
- PIDDLESSEN, S. J., STORCH, M. K., HIBBS, M., FREEMAN, A. M., LASSMANN, H. & MORGAN, B. P. 1994. Soluble recombinant complement receptor 1 inhibits inflammation and demyelination in antibody-mediated demyelinating experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*, 152, 5477-84.
- PIWIEN-PILIPUK, G., MACDOUGALD, O. & SCHWARTZ, J. 2002. Dual regulation of phosphorylation and dephosphorylation of C/EBPbeta modulate its transcriptional activation and DNA binding in response to growth hormone. *J Biol Chem*, 277, 44557-65.
- PLESS, O., KOWENZ-LEUTZ, E., KNOBLICH, M., LAUSEN, J., BEYERMANN, M., WALSH, M. J. & LEUTZ, A. 2008. G9a-mediated lysine methylation alters the function of CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *J Biol Chem*, 283, 26357-63.
- POLI, V. 1998. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem*, 273, 29279-82.
- POLI, V., MANCINI, F. P. & CORTESE, R. 1990. IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell*, 63, 643-53.
- POPE, R. M., LEUTZ, A. & NESS, S. A. 1994. C/EBP beta regulation of the tumor necrosis factor alpha gene. *J Clin Invest*, 94, 1449-55.
- PRINEAS, J. W. & PARRATT, J. D. 2012. Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol*, 72, 18-31.
- PROITSI, P., LUPTON, M. K., DUDBRIDGE, F., TSOLAKI, M., HAMILTON, G., DANIILIDOU, M., PRITCHARD, M., LORD, K., MARTIN, B. M., JOHNSON, J., CRAIG, D., TODD, S., MCGUINNESS, B., HOLLINGWORTH, P., HAROLD, D., KLOSZEWSKA, I., SOININEN, H., MECOCCHI, P., VELAS, B., GILL, M., LAWLOR, B., RUBINSZTEIN, D. C., BRAYNE, C., PASSMORE, P. A., WILLIAMS, J., LOVESTONE, S. & POWELL, J. F. 2012. Alzheimer's disease and age-related macular degeneration have different genetic models for complement gene variation. *Neurobiol Aging*, 33, 1843 e9-17.
- PU, W. T. & STRUHL, K. 1991. The leucine zipper symmetrically positions the adjacent basic regions for specific DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 6901-5.
- RAHMAN, S. M., CHOUDHURY, M., JANSSEN, R. C., BAQUERO, K. C., MIYAZAKI, M. & FRIEDMAN, J. E. 2013. CCAAT/enhancer binding protein beta deletion increases mitochondrial function and protects mice from LXR-induced hepatic steatosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 430, 336-9.
- RAHMAN, S. M., JANSSEN, R. C., CHOUDHURY, M., BAQUERO, K. C., AIKENS, R. M., DE LA HOUSSEY, B. A. & FRIEDMAN, J. E. 2012. CCAAT/enhancer-

- binding protein beta (C/EBPbeta) expression regulates dietary-induced inflammation in macrophages and adipose tissue in mice. *J Biol Chem*, 287, 34349-60.
- RAHPEYMAI, Y., HIETALA, M. A., WILHELMSSON, U., FOTHERINGHAM, A., DAVIES, I., NILSSON, A. K., ZWIRNER, J., WETSEL, R. A., GERARD, C., PEKNY, M. & PEKNA, M. 2006. Complement: a novel factor in basal and ischemia-induced neurogenesis. *EMBO J*, 25, 1364-74.
- RAMAGLIA, V., DAHA, M. R. & BAAS, F. 2008. The complement system in the peripheral nerve: friend or foe? *Mol Immunol*, 45, 3865-77.
- RAMJI, D. P. & FOKA, P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*, 365, 561-75.
- RANSOHOFF, R. M. 2011. Microglia and monocytes: 'tis plain the twain meet in the brain. *Nat Neurosci*, 14, 1098-100.
- RANSOHOFF, R. M. & STEVENS, B. 2011. Neuroscience. How many cell types does it take to wire a brain? *Science*, 333, 1391-2.
- RAY, A., GAO, X. & RAY, B. K. 1995a. Role of a distal enhancer containing a functional NF-kappa B-binding site in lipopolysaccharide-induced expression of a novel alpha 1-antitrypsin gene. *J Biol Chem*, 270, 29201-8.
- RAY, A., HANNINK, M. & RAY, B. K. 1995b. Concerted participation of NF-kappa B and C/EBP heteromer in lipopolysaccharide induction of serum amyloid A gene expression in liver. *J Biol Chem*, 270, 7365-74.
- RAY, A. & RAY, B. K. 1995. Lipopolysaccharide-mediated induction of the bovine interleukin-6 gene in monocytes requires both NF-kappa B and C/EBP binding sites. *DNA Cell Biol*, 14, 795-802.
- RICKLIN, D., HAJISHENGALLIS, G., YANG, K. & LAMBRIS, J. D. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 11, 785-97.
- RIGAULT, C., LE BORGNE, F. & DEMARQUOY, J. 2006. Genomic structure, alternative maturation and tissue expression of the human BBOX1 gene. *Biochim Biophys Acta*, 1761, 1469-81.
- RININGER, A., DEJESUS, C., TOTTEN, A., WAYLAND, A. & HALTERMAN, M. W. 2012. MKP-1 antagonizes C/EBPbeta activity and lowers the apoptotic threshold after ischemic injury. *Cell Death Differ*, 19, 1634-43.
- ROBINSON, G. W., JOHNSON, P. F., HENNIGHAUSEN, L. & STERNECK, E. 1998. The C/EBPbeta transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland. *Genes Dev*, 12, 1907-16.
- ROBLEDO, P., URSU, G. & MAHY, N. 1999. Effects of adenosine and gamma-aminobutyric acid A receptor antagonists on N-methyl-D-aspartate induced neurotoxicity in the rat hippocampus. *Hippocampus*, 9, 527-33.
- ROCK, R. B. & PETERSON, P. K. 2006. Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1, 117-26.
- ROHRER, B., LONG, Q., COUGHLIN, B., WILSON, R. B., HUANG, Y., QIAO, F., TANG, P. H., KUNCHITHAPAUTHAM, K., GILKESON, G. S. & TOMLINSON, S. 2009. A targeted inhibitor of the alternative complement pathway reduces angiogenesis in a mouse model of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 3056-64.
- ROMAN, C., PLATERO, J. S., SHUMAN, J. & CALAME, K. 1990. Ig/EBP-1: a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. *Genes Dev*, 4, 1404-15.

- RON, D. & HABENER, J. F. 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*, 6, 439-53.
- ROOS, A. B., BARTON, J. L., MILLER-LARSSON, A., DAHLBERG, B., BERG, T., DIDON, L. & NORD, M. 2012. Lung epithelial-C/EBP $\beta$  contributes to LPS-induced inflammation and its suppression by formoterol. *Biochem Biophys Res Commun*, 423, 134-9.
- ROOS, A. B. & NORD, M. 2012. The emerging role of C/EBPs in glucocorticoid signaling: lessons from the lung. *J Endocrinol*, 212, 291-305.
- ROSEN, E. D. 2005. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73, 31-4.
- ROSEN, E. D., SARRAF, P., TROY, A. E., BRADWIN, G., MOORE, K., MILSTONE, D. S., SPIEGELMAN, B. M. & MORTENSEN, R. M. 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*, 4, 611-7.
- ROTHWELL, N. J. & LUHESHI, G. N. 2000. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*, 23, 618-25.
- ROTSTEIN, M., BASSAN, H., KARIV, N., SPEISER, Z., HAREL, S. & GOZES, I. 2006. NAP enhances neurodevelopment of newborn apolipoprotein E-deficient mice subjected to hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther*, 319, 332-9.
- RUS, H. G., KIM, L. M., NICULESCU, F. I. & SHIN, M. L. 1992. Induction of C3 expression in astrocytes is regulated by cytokines and Newcastle disease virus. *J Immunol*, 148, 928-33.
- RUTKOWSKI, M. J., SUGHRUE, M. E., KANE, A. J., AHN, B. J., FANG, S. & PARSA, A. T. 2010a. The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. *Inflamm Res*, 59, 897-905.
- RUTKOWSKI, M. J., SUGHRUE, M. E., KANE, A. J., MILLS, S. A., FANG, S. & PARSA, A. T. 2010b. Complement and the central nervous system: emerging roles in development, protection and regeneration. *Immunol Cell Biol*, 88, 781-6.
- SAHU, A. & LAMBRIS, J. D. 2001. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev*, 180, 35-48.
- SAIJO, K., WINNER, B., CARSON, C. T., COLLIER, J. G., BOYER, L., ROSENFELD, M. G., GAGE, F. H. & GLASS, C. K. 2009. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell*, 137, 47-59.
- SAMUELSSON, M., RAMBERG, V. & IVERFELDT, K. 2008. Alzheimer amyloid-beta peptides block the activation of C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$  in glial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 370, 619-22.
- SCOTT, L. M., CIVIN, C. I., RORTH, P. & FRIEDMAN, A. D. 1992. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood*, 80, 1725-35.
- SCREPANTI, I., ROMANI, L., MUSIANI, P., MODESTI, A., FATTORI, E., LAZZARO, D., SELLITTO, C., SCARPA, S., BELLAVIA, D., LATTANZIO, G. & ET AL. 1995. Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *EMBO J*, 14, 1932-41.
- SCHAFER, D. P., LEHRMAN, E. K., KAUTZMAN, A. G., KOYAMA, R., MARDINLY, A. R., YAMASAKI, R., RANSOHOFF, R. M., GREENBERG, M. E., BARRES, B. A. & STEVENS, B. 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 74, 691-705.



- SCHIELKE, G. P., YANG, G. Y., SHIVERS, B. D. & BETZ, A. L. 1998. Reduced ischemic brain injury in interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18, 180-5.
- SCHMUED, L. C., ALBERTSON, C. & SLIKKER, W., JR. 1997. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res*, 751, 37-46.
- SCHREM, H., KLEMPNAUER, J. & BORLAK, J. 2004. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. *Pharmacol Rev*, 56, 291-330.
- SCHWAB, C. & MCGEER, P. L. 2002. Complement activated C4d immunoreactive oligodendrocytes delineate small cortical plaques in multiple sclerosis. *Exp Neurol*, 174, 81-8.
- SEAGROVES, T. N., KRNACIK, S., RAUGHT, B., GAY, J., BURGESS-BEUSSE, B., DARLINGTON, G. J. & ROSEN, J. M. 1998. C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev*, 12, 1917-28.
- SELKOE, D. J. 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 298, 789-91.
- SERRANO, G. E., LELUTIU, N., ROJAS, A., COCHI, S., SHAW, R., MAKINSON, C. D., WANG, D., FITZGERALD, G. A. & DINGLEDINE, R. 2011. Ablation of cyclooxygenase-2 in forebrain neurons is neuroprotective and dampens brain inflammation after status epilepticus. *J Neurosci*, 31, 14850-60.
- SERRAT, N., PEREIRA-LOPES, S., COMALADA, M., LLOBERAS, J. & CELADA, A. 2012. Deacetylation of C/EBPbeta is required for IL-4-induced arginase-1 expression in murine macrophages. *Eur J Immunol*, 42, 3028-37.
- SEWELL, D. L., NACEWICZ, B., LIU, F., MACVILAY, S., ERDEI, A., LAMBRIS, J. D., SANDOR, M. & FABRY, Z. 2004. Complement C3 and C5 play critical roles in traumatic brain cryoinjury: blocking effects on neutrophil extravasation by C5a receptor antagonist. *J Neuroimmunol*, 155, 55-63.
- SHEN, Y., LI, R., MCGEER, E. G. & MCGEER, P. L. 1997. Neuronal expression of mRNAs for complement proteins of the classical pathway in Alzheimer brain. *Brain Res*, 769, 391-5.
- SHI, S. S., YANG, W. Z., TU, X. K., WANG, C. H., CHEN, C. M. & CHEN, Y. 2013. 5-Lipoxygenase inhibitor zileuton inhibits neuronal apoptosis following focal cerebral ischemia. *Inflammation*, 36, 1209-17.
- SHINJO, N., STAHLBERG, A., DRAGUNOW, M., PEKONY, M. & PEKNA, M. 2009. Complement-derived anaphylatoxin C3a regulates in vitro differentiation and migration of neural progenitor cells. *Stem Cells*, 27, 2824-32.
- SHUMAN, J. D., VINSON, C. R. & MCKNIGHT, S. L. 1990. Evidence of changes in protease sensitivity and subunit exchange rate on DNA binding by C/EBP. *Science*, 249, 771-4.
- SIMI, A., TSAKIRI, N., WANG, P. & ROTHWELL, N. J. 2007. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem Soc Trans*, 35, 1122-6.
- SKALNIK, D. G. 2002. Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes. *Gene*, 284, 1-21.
- SOMBATI, S. & DELORENZO, R. J. 1995. Recurrent spontaneous seizure activity in hippocampal neuronal networks in culture. *J Neurophysiol*, 73, 1706-11.
- SONG, W. C., SARRIAS, M. R. & LAMBRIS, J. D. 2000. Complement and innate immunity. *Immunopharmacology*, 49, 187-98.

- SONG, Y., WEI, E. Q., ZHANG, W. P., GE, Q. F., LIU, J. R., WANG, M. L., HUANG, X. J., HU, X. & CHEN, Z. 2006. Minocycline protects PC12 cells against NMDA-induced injury via inhibiting 5-lipoxygenase activation. *Brain Res*, 1085, 57-67.
- STAHEL, P. F. & BARNUM, S. R. 1997. Bacterial meningitis: complement gene expression in the central nervous system. *Immunopharmacology*, 38, 65-72.
- STARKOV, A. A., CHINOPOULOS, C. & FISKUM, G. 2004. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium*, 36, 257-64.
- STEIN, B. & BALDWIN, A. S., JR. 1993. Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. *Mol Cell Biol*, 13, 7191-8.
- STEIN, B., COGSWELL, P. C. & BALDWIN, A. S., JR. 1993. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol Cell Biol*, 13, 3964-74.
- STEPHAN, A. H., BARRES, B. A. & STEVENS, B. 2012. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci*, 35, 369-89.
- STERNECK, E. & JOHNSON, P. F. 1998. CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling. *J Neurochem*, 70, 2424-33.
- STERNECK, E., TESSAROLLO, L. & JOHNSON, P. F. 1997. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev*, 11, 2153-62.
- STEVENS, B., ALLEN, N. J., VAZQUEZ, L. E., HOWELL, G. R., CHRISTOPHERSON, K. S., NOURI, N., MICHEVA, K. D., MEHALOW, A. K., HUBERMAN, A. D., STAFFORD, B., SHER, A., LITKE, A. M., LAMBRIS, J. D., SMITH, S. J., JOHN, S. W. & BARRES, B. A. 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, 131, 1164-78.
- STOILOVA, B., KOWENZ-LEUTZ, E., SCHELLER, M. & LEUTZ, A. 2013. Lymphoid to myeloid cell trans-differentiation is determined by C/EBPbeta structure and post-translational modifications. *PLoS One*, 8, e65169.
- STOLTZNER, S. E., GRENFELL, T. J., MORI, C., WISNIEWSKI, K. E., WISNIEWSKI, T. M., SELKOE, D. J. & LEMERE, C. A. 2000. Temporal accrual of complement proteins in amyloid plaques in Down's syndrome with Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 156, 489-99.
- STRACCIA, M., GRESA-ARRIBAS, N., DENTESANO, G., EJARQUE-ORTIZ, A., TUSELL, J. M., SERRATOSA, J., SOLA, C. & SAURA, J. 2011. Pro-inflammatory gene expression and neurotoxic effects of activated microglia are attenuated by absence of CCAAT/enhancer binding protein beta. *J Neuroinflammation*, 8, 156.
- STRAUSS, K. I., BARBE, M. F., MARSHALL, R. M., RAGHUPATHI, R., MEHTA, S. & NARAYAN, R. K. 2000. Prolonged cyclooxygenase-2 induction in neurons and glia following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma*, 17, 695-711.
- STROHMEYER, R., SHELTON, J., LOUGHEED, C. & BREITKOPF, T. 2014. CCAAT-Enhancer Binding Protein-beta Expression and Elevation in Alzheimer's Disease and Microglial Cell Cultures. *PLoS One*, 9, e86617.
- SUN, D. A., SOMBATI, S., BLAIR, R. E. & DELORENZO, R. J. 2002a. Calcium-dependent epileptogenesis in an in vitro model of stroke-induced "epilepsy". *Epilepsia*, 43, 1296-305.
- SUN, Z., DEL MAR, N., MEADE, C., GOLDOWITZ, D. & REINER, A. 2002b. Differential changes in striatal projection neurons in R6/2 transgenic mice for Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, 11, 369-85.

- SUZUMURA, A. 2009. [Neurotoxicity by microglia: the mechanisms and potential therapeutic strategy]. *Fukuoka Igaku Zasshi*, 100, 243-7.
- TACK, B. D. & PRAHL, J. W. 1976. Third component of human complement: purification from plasma and physicochemical characterization. *Biochemistry*, 15, 4513-21.
- TACK, B. F., HARRISON, R. A., JANATOVA, J., THOMAS, M. L. & PRAHL, J. W. 1980. Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 5764-8.
- TAGATA, Y., YOSHIDA, H., NGUYEN, L. A., KATO, H., ICHIKAWA, H., TASHIRO, F. & KITABAYASHI, I. 2008. Phosphorylation of PML is essential for activation of C/EBP epsilon and PU.1 to accelerate granulocytic differentiation. *Leukemia*, 22, 273-80.
- TAKABAYASHI, T., SHIMIZU, S., CLARK, B. D., BEINBORN, M., BURKE, J. F. & GELFAND, J. A. 2004. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery*, 135, 544-54.
- TAKIMOTO, Y., QIAN, H. Y., YOSHIGAI, E., OKUMURA, T., IKEYA, Y. & NISHIZAWA, M. 2013. Gomisins in the herbal drug gomishi (*Schisandra chinensis*) suppresses inducible nitric oxide synthase gene via C/EBPbeta and NF-kappaB in rat hepatocytes. *Nitric Oxide*, 28, 47-56.
- TANAKA, T., AKIRA, S., YOSHIDA, K., UMEMOTO, M., YONEDA, Y., SHIRAFUJI, N., FUJIWARA, H., SUEMATSU, S., YOSHIDA, N. & KISHIMOTO, T. 1995. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell*, 80, 353-61.
- TANAKA, T., YOSHIDA, N., KISHIMOTO, T. & AKIRA, S. 1997. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J*, 16, 7432-43.
- TANG, Q. Q., GRONBORG, M., HUANG, H., KIM, J. W., OTTO, T. C., PANDEY, A. & LANE, M. D. 2005. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9766-71.
- TAUBENFELD, S. M., MILEKIC, M. H., MONTI, B. & ALBERINI, C. M. 2001a. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci*, 4, 813-8.
- TAUBENFELD, S. M., WIIG, K. A., MONTI, B., DOLAN, B., POLLONINI, G. & ALBERINI, C. M. 2001b. Fornix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein [beta] and [delta] Co-localizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. *J Neurosci*, 21, 84-91.
- TAYLOR, G. R., CARTER, G. I., CROW, T. J., JOHNSON, J. A., FAIRBAIRN, A. F., PERRY, E. K. & PERRY, R. H. 1986. Recovery and measurement of specific RNA species from postmortem brain tissue: a general reduction in Alzheimer's disease detected by molecular hybridization. *Exp Mol Pathol*, 44, 111-6.
- TEISMANN, P., VILA, M., CHOI, D. K., TIEU, K., WU, D. C., JACKSON-LEWIS, V. & PRZEDBORSKI, S. 2003. COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 272-7.
- TEN, V. S., SOSUNOV, S. A., MAZER, S. P., STARK, R. I., CASPERSEN, C., SUGHRUE, M. E., BOTTO, M., CONNOLLY, E. S., JR. & PINSKY, D. J. 2005. C1q-deficiency is neuroprotective against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. *Stroke*, 36, 2244-50.

- TENGKU-MUHAMMAD, T. S., HUGHES, T. R., FOKA, P., CRYER, A. & RAMJI, D. P. 2000a. Cytokine-mediated differential regulation of macrophage activator protein-1 genes. *Cytokine*, 12, 720-6.
- TENGKU-MUHAMMAD, T. S., HUGHES, T. R., RANKI, H., CRYER, A. & RAMJI, D. P. 2000b. Differential regulation of macrophage CCAAT-enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines. *Cytokine*, 12, 1430-6.
- TERAI, K., WALKER, D. G., MCGEER, E. G. & MCGEER, P. L. 1997. Neurons express proteins of the classical complement pathway in Alzheimer disease. *Brain Res*, 769, 385-90.
- THOMPSON, A. B., BOHLING, T., PAYVANDI, F. & RENNARD, S. I. 1990. Lower respiratory tract lactoferrin and lysozyme arise primarily in the airways and are elevated in association with chronic bronchitis. *J Lab Clin Med*, 115, 148-58.
- TOCCO, G., FREIRE-MOAR, J., SCHREIBER, S. S., SAKHI, S. H., AISEN, P. S. & PASINETTI, G. M. 1997. Maturational regulation and regional induction of cyclooxygenase-2 in rat brain: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 144, 339-49.
- TREMBLAY, M. E. 2011. The role of microglia at synapses in the healthy CNS: novel insights from recent imaging studies. *Neuron Glia Biol*, 7, 67-76.
- TREMBLAY, M. E. & MAJEWSKA, A. K. 2011. A role for microglia in synaptic plasticity? *Commun Integr Biol*, 4, 220-2.
- TREMBLAY, M. E., STEVENS, B., SIERRA, A., WAKE, H., BESSIS, A. & NIMMERJAHN, A. 2011. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci*, 31, 16064-9.
- TSUKADA, J., YOSHIDA, Y., KOMINATO, Y. & AURON, P. E. 2011. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine*, 54, 6-19.
- UGARTE, G. D., DIAZ, E., BISCAIA, M., STEHBERG, J., MONTECINO, M. & VAN ZUNDERT, B. 2013. Transcription of the pain-related TRPV1 gene requires Runx1 and C/EBPbeta factors. *J Cell Physiol*, 228, 860-70.
- UZ, T., PESOLD, C., LONGONE, P. & MANEV, H. 1998. Aging-associated up-regulation of neuronal 5-lipoxygenase expression: putative role in neuronal vulnerability. *FASEB J*, 12, 439-49.
- VALENTE, T., MANCERA, P., TUSELL, J. M., SERRATOSA, J. & SAURA, J. 2012. C/EBPbeta expression in activated microglia in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*, 33, 2186-99.
- VALENTE, T., STRACCIA, M., GRESA-ARRIBAS, N., DENTESANO, G., TUSELL, J. M., SERRATOSA, J., MANCERA, P., SOLA, C. & SAURA, J. 2013. CCAAT/enhancer binding protein delta regulates glial proinflammatory gene expression. *Neurobiol Aging*, 34, 2110-24.
- VAN BEEK, J., ELWARD, K. & GASQUE, P. 2003. Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci*, 992, 56-71.
- VAN GASSEN, K. L., DE WIT, M., KOERKAMP, M. J., RENSEN, M. G., VAN RIJEN, P. C., HOLSTEGE, F. C., LINDHOUT, D. & DE GRAAN, P. N. 2008. Possible role of the innate immunity in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 49, 1055-65.
- VAZ, F. M. & WANDERS, R. J. 2002. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J*, 361, 417-29.
- VEERHUIS, R., NIELSEN, H. M. & TENNER, A. J. 2011. Complement in the brain. *Mol Immunol*, 48, 1592-603.

- VERNOCHET, C., PERES, S. B. & FARMER, S. R. 2009. Mechanisms of obesity and related pathologies: transcriptional control of adipose tissue development. *FEBS J*, 276, 5729-37.
- VEZZANI, A., BALOSSO, S. & RAVIZZA, T. 2008. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav Immun*, 22, 797-803.
- VINCENT, A. J., TAYLOR, J. M., CHOI-LUNDBERG, D. L., WEST, A. K. & CHUAH, M. I. 2005. Genetic expression profile of olfactory ensheathing cells is distinct from that of Schwann cells and astrocytes. *Glia*, 51, 132-47.
- WADLEIGH, D. J., REDDY, S. T., KOPP, E., GHOSH, S. & HERSCHMAN, H. R. 2000. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem*, 275, 6259-66.
- WALKER, D. G. & MCGEER, P. L. 1992. Complement gene expression in human brain: comparison between normal and Alzheimer disease cases. *Brain Res Mol Brain Res*, 14, 109-16.
- WALKER, K. R. & TESCO, G. 2013. Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury. *Front Aging Neurosci*, 5, 29.
- WANG, N. D., FINEGOLD, M. J., BRADLEY, A., OU, C. N., ABDELSAYED, S. V., WILDE, M. D., TAYLOR, L. R., WILSON, D. R. & DARLINGTON, G. J. 1995. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science*, 269, 1108-12.
- WANG, Q., YU, S., SIMONYI, A., SUN, G. Y. & SUN, A. Y. 2005. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol*, 31, 3-16.
- WANG, W., TAYLOR, R. N., BAGCHI, I. C. & BAGCHI, M. K. 2012. Regulation of human endometrial stromal proliferation and differentiation by C/EBPbeta involves cyclin E-cdk2 and STAT3. *Mol Endocrinol*, 26, 2016-30.
- WANG, W. L., LEE, Y. C., YANG, W. M., CHANG, W. C. & WANG, J. M. 2008. Sumoylation of LAP1 is involved in the HDAC4-mediated repression of COX-2 transcription. *Nucleic Acids Res*, 36, 6066-79.
- WANG, X. Z., KURODA, M., SOK, J., BATCHVAROVA, N., KIMMEL, R., CHUNG, P., ZINSZNER, H. & RON, D. 1998. Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *EMBO J*, 17, 3619-30.
- WANG, Y., HANCOCK, A. M., BRADNER, J., CHUNG, K. A., QUINN, J. F., PESKIND, E. R., GALASKO, D., JANKOVIC, J., ZABETIAN, C. P., KIM, H. M., LEVERENZ, J. B., MONTINE, T. J., GINGHINA, C., EDWARDS, K. L., SNAPINN, K. W., GOLDSTEIN, D. S., SHI, M. & ZHANG, J. 2011. Complement 3 and factor h in human cerebrospinal fluid in Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and multiple-system atrophy. *Am J Pathol*, 178, 1509-16.
- WANG, Y. & JIANG, Q. 2013. gamma-Tocotrienol inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factor by suppressing C/EBPbeta and NF-kappaB in macrophages. *J Nutr Biochem*, 24, 1146-52.
- WESSELLS, J., YAKAR, S. & JOHNSON, P. F. 2004. Critical prosurvival roles for C/EBP beta and insulin-like growth factor I in macrophage tumor cells. *Mol Cell Biol*, 24, 3238-50.
- WESTMACOTT, A., BURKE, Z. D., OLIVER, G., SLACK, J. M. & TOSH, D. 2006. C/EBPalpha and C/EBPbeta are markers of early liver development. *Int J Dev Biol*, 50, 653-7.
- WHITEHEAD, A. S., SOLOMON, E., CHAMBERS, S., BODMER, W. F., POVEY, S. & FEY, G. 1982. Assignment of the structural gene for the third component of human complement to chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 5021-5.

- WHITNEY, K. D. & MCNAMARA, J. O. 2000. GluR3 autoantibodies destroy neural cells in a complement-dependent manner modulated by complement regulatory proteins. *J Neurosci*, 20, 7307-16.
- WILSON, S. P., YEOMANS, D. C., BENDER, M. A., LU, Y., GOINS, W. F. & GLORIOSO, J. C. 1999. Antihyperalgesic effects of infection with a preproenkephalin-encoding herpes virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 3211-6.
- WILLIAMS, S. C., BAER, M., DILLNER, A. J. & JOHNSON, P. F. 1995. CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *EMBO J*, 14, 3170-83.
- WILLIAMS, S. C., CANTWELL, C. A. & JOHNSON, P. F. 1991. A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev*, 5, 1553-67.
- WOODRUFF, T. M., AGER, R. R., TENNER, A. J., NOAKES, P. G. & TAYLOR, S. M. 2010. The role of the complement system and the activation fragment C5a in the central nervous system. *Neuromolecular Med*, 12, 179-92.
- WREN, D. R. & NOBLE, M. 1989. Oligodendrocytes and oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cells of adult rats are specifically susceptible to the lytic effects of complement in absence of antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 9025-9.
- WU, K. K., LIOU, J. Y. & CIESLIK, K. 2005. Transcriptional Control of COX-2 via C/EBPbeta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 679-85.
- WYSS-CORAY, T., YAN, F., LIN, A. H., LAMBRIS, J. D., ALEXANDER, J. J., QUIGG, R. J. & MASLIAH, E. 2002. Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10837-42.
- XIONG, Z. Q. & MCNAMARA, J. O. 2002. Fleeting activation of ionotropic glutamate receptors sensitizes cortical neurons to complement attack. *Neuron*, 36, 363-74.
- XIONG, Z. Q., QIAN, W., SUZUKI, K. & MCNAMARA, J. O. 2003. Formation of complement membrane attack complex in mammalian cerebral cortex evokes seizures and neurodegeneration. *J Neurosci*, 23, 955-60.
- XU, M., NIE, L., KIM, S. H. & SUN, X. H. 2003. STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta. *EMBO J*, 22, 893-904.
- YAMANAKA, R., BARLOW, C., LEKSTROM-HIMES, J., CASTILLA, L. H., LIU, P. P., ECKHAUS, M., DECKER, T., WYNshaw-BORIS, A. & XANTHOPOULOS, K. G. 1997. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 13187-92.
- YAN, C., JOHNSON, P. F., TANG, H., YE, Y., WU, M. & GAO, H. 2013. CCAAT/enhancer-binding protein delta is a critical mediator of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Am J Pathol*, 182, 420-30.
- YANG, J., AHN, H. N., CHANG, M., NARASIMHAN, P., CHAN, P. H. & SONG, Y. S. 2013. Complement component 3 inhibition by an antioxidant is neuroprotective after cerebral ischemia and reperfusion in mice. *J Neurochem*, 124, 523-35.
- YANG, S., NAKAMURA, T., HUA, Y., KEEP, R. F., YOUNGER, J. G., HE, Y., HOFF, J. T. & XI, G. 2006a. The role of complement C3 in intracerebral hemorrhage-induced brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26, 1490-5.
- YANG, S., NAKAMURA, T., HUA, Y., KEEP, R. F., YOUNGER, J. G., HOFF, J. T. & XI, G. 2006b. Intracerebral hemorrhage in complement C3-deficient mice. *Acta Neurochir Suppl*, 96, 227-31.

- YANG, Z., WARA-ASWAPATI, N., CHEN, C., TSUKADA, J. & AURON, P. E. 2000. NF-IL6 (C/EBPbeta ) vigorously activates il1b gene expression via a Spi-1 (PU.1) protein-protein tether. *J Biol Chem*, 275, 21272-7.
- YE, S., XU, H., JIN, J., YANG, M., WANG, C., YU, Y. & CAO, X. 2012. The E3 ubiquitin ligase neuregulin receptor degradation protein 1 (Nrpd1) promotes M2 macrophage polarization by ubiquitinating and activating transcription factor CCAAT/enhancer-binding Protein beta (C/EBPbeta). *J Biol Chem*, 287, 26740-8.
- YEFET, K., MERHAV, M., KUULMANN-VANDER, S., ELKOBI, A., BELELOVSKY, K., JACOBSON-PICK, S., MEIRI, N. & ROSENBLUM, K. 2006. Different signal transduction cascades are activated simultaneously in the rat insular cortex and hippocampus following novel taste learning. *Eur J Neurosci*, 24, 1434-42.
- YI, J. H., PARK, S. W., KAPADIA, R. & VEMUGANTI, R. 2007. Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. *Neurochem Int*, 50, 1014-27.
- YIANGOU, M., SCOTT, S. G., RABEK, J. P., AN, M. R., XIONG, W. & PAPACONSTANTINO, J. 2001. Effects of mercuric chloride on the regulation of expression of the acute phase response components alpha(1)-acid glycoprotein and C/EBP transcription factors. *Biochim Biophys Acta*, 1518, 47-56.
- YUKAWA, K., TANAKA, T., TSUJI, S. & AKIRA, S. 1998. Expressions of CCAAT/Enhancer-binding proteins beta and delta and their activities are intensified by cAMP signaling as well as Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinases activation in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 273, 31345-51.
- ZAHNOW, C. A. 2002. CCAAT/enhancer binding proteins in normal mammary development and breast cancer. *Breast Cancer Res*, 4, 113-21.
- ZAHNOW, C. A. 2009. CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Rev Mol Med*, 11, e12.
- ZAMOSTIANO, R., PINHASOV, A., GELBER, E., STEINGART, R. A., SEROUSSI, E., GILADI, E., BASSAN, M., WOLLMAN, Y., EYRE, H. J., MULLEY, J. C., BRENNEMAN, D. E. & GOZES, I. 2001. Cloning and characterization of the human activity-dependent neuroprotective protein. *J Biol Chem*, 276, 708-14.
- ZANJANI, H., FINCH, C. E., KEMPER, C., ATKINSON, J., MCKEEL, D., MORRIS, J. C. & PRICE, J. L. 2005. Complement activation in very early Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 19, 55-66.
- ZEMLYAK, I., MANLEY, N., VULIH-SHULTZMAN, I., CUTLER, A. B., GRABER, K., SAPOLSKY, R. M. & GOZES, I. 2009. The microtubule interacting drug candidate NAP protects against kainic acid toxicity in a rat model of epilepsy. *J Neurochem*, 111, 1252-63.
- ZHANG, L., ZHANG, W. P., HU, H., WANG, M. L., SHENG, W. W., YAO, H. T., DING, W., CHEN, Z. & WEI, E. Q. 2006. Expression patterns of 5-lipoxygenase in human brain with traumatic injury and astrocytoma. *Neuropathology*, 26, 99-106.
- ZHAO, X. Y., ZHAO, K. W., JIANG, Y., ZHAO, M. & CHEN, G. Q. 2011. Synergistic induction of galectin-1 by CCAAT/enhancer binding protein alpha and hypoxia-inducible factor 1alpha and its role in differentiation of acute myeloid leukemic cells. *J Biol Chem*, 286, 36808-19.
- ZHOU, W. 2012. The new face of anaphylatoxins in immune regulation. *Immunobiology*, 217, 225-34.
- ZHU, M. S., LIU, D. G., CHENG, H. Q., XU, X. Y. & LI, Z. P. 1997. Expression of exogenous NF-IL6 induces apoptosis in Sp2/0-Ag14 myeloma cells. *DNA Cell Biol*, 16, 127-35.

- ZHU, S., YOON, K., STERNECK, E., JOHNSON, P. F. & SMART, R. C. 2002. CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 207-12.
- ZINSZNER, H., KURODA, M., WANG, X., BATCHVAROVA, N., LIGHTFOOT, R. T., REMOTTI, H., STEVENS, J. L. & RON, D. 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 12, 982-95.
- ZIPFEL, P. F. & SKERKA, C. 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*, 9, 729-40.
- ZVEJNIECE, L., SVALBE, B., MAKRECKA, M., LIEPINSH, E., KALVINSH, I. & DAMBROVA, M. 2010. Mildronate exerts acute anticonvulsant and antihypnotic effects. *Behav Pharmacol*, 21, 548-55.